

Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Veterinarie

Programma in Medicina Veterinaria

**Lavaggio bronco-alveolare nel cavallo:
standardizzazione della metodica e studio di alcune
variabili in grado di influenzare la valutazione del BALF**

Candidato: Dr Rinaldo Fusar Bassini

Tutor: Prof Michele Corazza

INDICE

RIASSUNTO pag. 6

SUMMARY pag. 6

INTRODUZIONE pag. 8

STORIA pag. 9

LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (Broncho-Alveolar Lavage – BAL) pag. 10

Sedazione pag. 12

Tecnica alla cieca pag. 13

Tecnica endoscopica pag. 13

Complicazioni pag. 15

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL BALF pag. 17

ALLESTIMENTO DEL PREPARATO CITOLOGICO pag. 19

VALUTAZIONE MACROSCOPICA DEL PREPARATO CITOLOGICO pag. 22

Muco pag. 22

Colore pag. 23

Odore pag. 23

CONTA CELLULARE TOTALE pag. 24

CONTA CELLULARE DIFFERENZIALE pag. 26

ELEMENTI CELLULARI E NON CELLULARI PRESENTI NEL BALF pag. 28

Cellule infiammatorie pag. 28

Muco pag. 28

Cellule epiteliali pag. 29

Materiale estraneo pag. 30

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CONTA DIFFERENZIALE pag. 31

L'ESAME BATTERIOLOGICO pag. 33

Batteri più frequentemente isolati da polmone di cavallo adulto e puledro pag. 34

QUADRO CITOLOGICO IN RELAZIONE A PATOLOGIE RESPIRATORIE pag. 35

Flogosi settica pag. 35

Flogosi delle vie profonde (IAD/SAID) pag. 36

Pneumopatia cronica ostruttiva (COPD/RAO) pag. 37

Emorragia polmonare da sforzo (EIPH) pag. 38

Infezioni da virus pag. 40

Infezioni da funghi pag. 40

Infezioni da protozoi pag. 40

PARTE SPERIMENTALE

Prova sperimentale 1 - STANDARDIZZAZIONE DELLA METODICA DI ESECUZIONE DEL BAL pag. 44

Introduzione pag. 44

Materiali e Metodi pag. 44

Gestione cavalle pag. 44

Contenimento pag. 45

Sedazione ed anestesia locale pag. 45

Sito di prelievo e materiale per il campionamento pag. 46

BAL mediante tecnica endoscopica standardizzata pag. 47

Esame citologico pag. 48

Risultati pag. 49

Conclusioni pag. 50

Prova sperimentale 2a - VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA' NELLA LETTURA DEI WBC E DELLA QUANTITA' DI MUCO NEL BALF pag. 52

Introduzione pag. 52

Materiali e Metodi pag. 52

Gestione cavalle pag. 53

Criteri d'inclusione pag. 53

Analisi statistica pag. 55

Risultati pag. 56

Discussioni e Conclusioni pag. 59

Prova sperimentale 2b - BAL NEL CAVALLO: CONFRONTO TRA ALIQUOTE SEQUENZIALI E POOL pag. 61

Introduzione pag. 61

Materiali e Metodi pag. 62

Gestione cavalle pag. 62

Criteri d'inclusione pag. 63

Analisi statistica pag. 64

Risultati pag. 65

Discussioni e Conclusioni pag. 65

Prova sperimentale 2c- VALUTAZIONE CITOLOGICA PRIMA E POST STIMOLAZIONE AMBIENTALE pag. 68

Introduzione pag. 68

Materiali e Metodi pag. 68

Gestione cavalle pag. 69

Criteri d'inclusione pag. 69

Stimolazione ambientale pag. 70

Esecuzione del BAL pag. 70

Analisi statistica pag. 71

Risultati pag. 71

Esame citologico pag. 71

Esame batteriologico pag. 72

Tecnica PCR pag. 73

Discussioni e Conclusioni pag. 74

CONCLUSIONI GENERALI pag. 76

BIBLIOGRAFIA pag. 78

PUBBLICAZIONI 86

C'è qualcosa nell'esteriorità di un cavallo che si attaglia all'interiorità di un uomo

Sir W. Churchill

RIASSUNTO

Lo scopo di questa dissertazione è stato quello di riassumere quanto conosciuto sul lavaggio broncoalveolare e di valutare alcune variabili in grado di influenzare la valutazione del liquido refluo del lavaggio broncoalveolare (BALF).

Prova sperimentale 1. Lo scopo di questa prima prova è stato quello di determinare una metodica standardizzata per l'esecuzione del BAL mediante tecnica endoscopica. Le indicazioni per l'esecuzione del BAL sono la tosse, lo scarso rendimento atletico, la presenza di muco in trachea e l'epistassi post-esercizio. Il BAL permette la raccolta di secrezioni provenienti dalle vie aeree più distali ed è consigliato nella diagnosi di processi infiammatori diffusi e/o cronici che caratterizzano la IAD, RAO e EIPH.

Prova sperimentale 2a. Lo scopo è stato quello di valutare: 1) la ripetibilità della lettura dei WBC al contaglobuli; 2) valutare la torbidità del BALF per la quantificazione del muco.

Materiali e metodi. Il muco tracheale è stato quantificato come riportato in letteratura. 31 BALF sono stati valutati 3 volte consecutivamente mediante un contaglobuli e mediante spettrofotometria. E' stata applicata l'analisi statistica.

Discussione e conclusioni. I nostri risultati confermano la ripetibilità della lettura dei WBC al contaglobuli e l'utilità della valutazione della torbidità del BALF con spettrofotometria per la quantificazione oggettiva del muco.

Prova sperimentale 2b. Lo scopo è stato quello di valutare aliquote sequenziali e un pool di queste per verificare differenze nella valutazione della conta cellulare differenziale.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 10 BALF raccolti ciascuno in 3 aliquote sequenziali. Da queste è stato ottenuto un pool. La conta differenziale dei macrofagi, linfociti e neutrofili presenta una variabilità di lettura tra le diverse aliquote e il loro pool.

Discussione e conclusioni. Le aliquote non possono essere considerate rappresentative della conta differenziale del BALF.

Prova sperimentale 2c. Lo scopo è stato quello di verificare le variazioni citologiche e batteriologiche del BALF prima e dopo stimolazione ambientale.

Materiali e metodi. 10 cavalli sani sono stati inclusi nel presente studio. Il BALF è stato raccolto prima e dopo una stimolazione ambientale di 15 giorni e valutato dal punto di vista citologico e batteriologico. L'analisi statistica è stata applicata.

Discussione e Conclusioni. Dopo la stimolazione ambientale alcune popolazioni cellulari subiscono una variazione. I batteri isolati sono tutti commensali.

Parole chiave. Cavallo, BALF, valutazione citologica.

SUMMARY

The aim of this thesis is to review the update scientific literature concerning broncho-alveolar lavage (BAL) and to assess some of the variables affecting the collection and the evaluation of broncho-alveolar lavage fluid (BALF).

Experimental trial 1. The aim of this trial was to determine a standardized method for bronchoalveolar lavage.

Experimental trial 2a. To evaluate: 1) repeatability in BALF WBC count; 2) turbidity evaluation of BALF for mucus quantification.

Materials and methods. BAL was performed in 31 healthy trotter mare aged 3-6 years. Tracheal mucus was quantified by a scoring system (0-5). BALF was evaluated 3 times consecutively by a cell counter for WBC and by a spectrophotometer for turbidity (DO). Statistical analysis was performed.

Discussion and conclusions. Our results confirm the repeatability of WBC evaluation by a cell counter and the usefulness of turbidity evaluation of BALF with a spectrophotometer for mucus quantification.

Experimental trial 2b. The aim of the present paper was to evaluate BALF collected in sequential aliquots vs pooled aliquots to verify intergroup differences.

Materials and methods. 10 BALF was collected in 3 sequential aliquots. A pooled aliquot was then obtained from the 3 sequential ones. All the aliquots were evaluated for total and differential cell count. Statistical analysis was performed.

Discussion and conclusions.

Experimental trial 2c. The aim was to verify variations in cytology and bacteriology of BALF obtained pre- and post-challenge in healthy not performing horses.

Materials and methods. 10 BALF specimens were collected for cytology and microbiology pre- and post- environmental challenge. Mucus was quantified. Statistical analysis was applied.

Discussion and conclusions. After challenge, the total number of cells/ μ l, neutrophils, eosinophils percentages and mucus were increased, as reported in horses with respiratory diseases. Bacteria isolated were commensal.

Key words. Horse, BALF, cytological evaluation.

INTRODUZIONE

La broncoscopia è un esame collaterale indispensabile per completare la valutazione clinica delle malattie delle vie respiratorie. Nel cavallo atleta assume particolare importanza perché taluni soggetti sono affetti da malattie delle basse vie respiratorie, paucisintomatiche a riposo, che sono responsabili di riduzioni consistenti del rendimento sportivo. L'esame endoscopico in questi casi fornisce indicazioni sullo stato della mucosa tracheale, bronchiale e sulla quantità di secreto attraverso la visualizzazione diretta e permette con il Lavaggio bronco-alveolare (BAL) e Tracheale (TW) di raccogliere materiale utile per l'esame citologico e batteriologico. Nelle ultime due decadi sono stati pubblicati numerosi studi che hanno avuto come scopo quello di standardizzare a) le manovre tecniche del prelievo, b) le modalità di conservazione del campione, c) la conta totale delle cellule nucleate, d) l'allestimento dei preparati e le colorazioni da utilizzare, e) l'interpretazione del quadro citologico. Sebbene lo stato dell'arte di questa pratica abbia raggiunto un ottimo livello, esistono relative discordie proprio sull'interpretazione del quadro citologico dei soggetti sani e scarsa univocità sul nome da attribuire sui vari pattern cellulari osservabili nelle tre principali forme di malattie delle basse vie respiratorie.

Lo scopo di questa dissertazione è quello di riassumere quanto conosciuto sull'argomento e di valutare alcune variabili in grado di influenzare la valutazione del liquido refluo del lavaggio broncoalveolare (BALF).

STORIA

Lo sviluppo delle tecniche diagnostiche in medicina equina hanno seguito l'evoluzione della medicina umana. In passato nell'uomo la valutazione delle forme infiammatorie dell'apparato respiratorio erano valutate attraverso l'analisi di campioni di *sputum*, aspirati tracheali, citologia ad ago sottile e biopsie polmonari. Allo stesso modo, la diagnosi delle malattie respiratorie del cavallo si basava soprattutto sulle analisi degli aspirati tracheali e raramente sulle biopsie polmonari.

L'aspirato tracheale è un'indagine collaterale usata soprattutto negli anni '70-'80 per la raccolta di campioni da utilizzare per le analisi citologiche e batteriologiche.

In questi anni sono stati pubblicati articoli in cui vengono riportati valori di riferimento per la citologia relativa sia a soggetti sani che malati (Mansmann e Knight, 1972; Beech, 1975).

Con l'avvento degli endoscopi flessibili, grazie al dr. Ikeda a partire dal 1968, si è osservato un cambiamento sostanziale nelle possibilità diagnostiche in campo umano e di conseguenza anche in medicina veterinaria. Sebbene il fibroscopio sia stato inizialmente utilizzato solo per scopi scientifici per lo studio di patologie immunomediate come la sarcoidosi e la fibrosi polmonare idiopatica nell'uomo, presto è risultato ovvio che questa tecnica miniminvasiva potesse essere utilizzata anche in campo clinico per la diagnosi di tutte le patologie infiammatorie dell'apparato respiratorio mediante il lavaggio broncoalveolare (BAL). Quindi con l'endoscopio è divenuto possibile ottenere con una procedura minimamente invasiva campioni che rappresentano specificatamente le basse vie respiratorie. A partire dagli anni '80 anche in medicina equina è stato utilizzato il BAL come indagine collaterale delle vie aeree profonde (Viel, 1980).

LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (Broncho-Alveolar Lavage – BAL)

Il campionamento di materiale biologico delle basse vie respiratorie ha come scopo principale quello di poter eseguire l'esame citologico e batteriologico. Le metodiche più utilizzate per eseguire questo tipo di campionamento sono tre: il lavaggio tracheale (TW) o l'aspirato tracheale (TA), il lavaggio bronco-alveolare (BAL) e la toracocentesi. Tutte queste metodiche possono essere eseguite sia "in campo" che in strutture attrezzate.

L'indicazione clinica per eseguire una di queste tecniche comprende tosse, *poor performance*, presenza di muco o sangue in trachea, epistassi, febbre di origine sconosciuta e dispnea. Sulla base dell'anamnesi ambientale, remota e prossima e dell'esame clinico può essere più indicata una metodica piuttosto di un'altra al fine di poter scegliere quale sia la più corretta per eseguire il campionamento.

L'aspirato tracheale (AT) consente di campionare le secrezioni provenienti dalla trachea, dai bronchi, e da territori polmonari poco più distali, che hanno raggiunto la trachea grazie alla *clearance* mucociliare. L'aspirato tracheale è indicato in caso di sospetta broncopolmonite batterica, pleuropolmonite batterica o di febbre di origine sconosciuta.

Il lavaggio bronco-alveolare (BAL) permette di raccogliere secrezioni da territori polmonari ancor più distali, appunto bronchiolo-alveolari, e di una regione definita del polmone. Il lavaggio bronco-alveolare è indicato in caso di patologie su base infiammatoria (IAD), allergica (RAO) o l'emorragia polmonare da sforzo atletico (EIPH) in cui gran parte del parenchima polmonare viene coinvolto.

Il BAL è un esame che viene più frequentemente utilizzato per la diagnosi di processi diffusivi o cronici dell'apparato respiratorio. In questi casi, infatti, i campionamenti eseguiti su uno dei due polmoni si possono considerare rappresentativi di entrambi (McGorum et al., 1993a). Sul materiale biologico campionato viene eseguito sempre un esame citologico e in alcuni casi può essere indicato eseguire anche un esame batteriologico.

Il BAL può essere effettuato sia con tecnica endoscopica che "alla cieca". La tecnica alla cieca è una valida alternativa all'utilizzo dell'endoscopio se non si ritiene necessaria un'attenta visualizzazione delle vie aeree, richiede un supporto tecnico minimo, è a basso costo e facile da effettuare. L'utilizzo dell'endoscopio ha il

vantaggio di poter visualizzare le strutture aeree fino alle basse vie e segnalare eventuali alterazioni patologiche correlabili con la patologia respiratoria sospettata (edema, broncospasmo) e la presenza di secrezioni e/o sangue (Hewson e Viel, 2002). Per effettuare il BAL nella maggior parte dei soggetti adulti, è necessario che l'endoscopio sia lungo almeno 160-180 cm. La profondità del polmone lavato dipenderà dal diametro esterno dello strumento. In quasi tutti i soggetti adulti, un diametro esterno di 10-13 mm garantirà il lavaggio dei bronchi di III-VI grado, ciò permette il recupero di cellule provenienti da un ampio numero di bronchioli ed alveoli (Hewson e Viel, 2002). Al contrario, l'uso di uno strumento o di un catetere con un diametro inferiore consente il lavaggio di un numero ridotto di bronchioli ed alveoli, poiché vengono raggiunti i bronchioli più profondi e periferici.

Rispetto alla metodica alla cieca, l'endoscopio permette anche la visualizzazione delle vie aeree. La presenza di anomalie anatomiche o l'accumulo di secrezioni, muco, pus o di sangue, in questo modo possono essere registrate e descritte la localizzazione, la quantità e le sue caratteristiche. Inoltre se si sospetta la presenza di uno o più ascessi si dovrebbero poter identificare i bronchi dai quali fuoriesce il materiale purulento al fine di poterne effettuare un campionamento. Può essere esaminato attentamente il naso-faringe e la trachea dovrebbe ispezionata per l'iperemia e per la qualità delle secrezioni (Hewson e Viel, 2002).

In un recente lavoro è stato proposto un punteggio per valutare quantitativamente il muco presente in trachea (Holcombe et al., 2001; Gerber et al., 2004). Gli autori danno un punteggio uguale a 0 se non è presente muco; 1 se sono presenti singole gocce di muco; 2 se sono presenti molte bolle, a volte confluenti; 3 se il muco è confluyente ventralmente; 4 se è presente molto muco nella porzione ventrale della trachea; 5 se il muco occupa il 25% e oltre della trachea.

Dovrebbero essere segnalate raccolte di secrezioni diverse dal muco, registrata la loro localizzazione (terzo superiore, medio o inferiore della trachea), la quantità, il colore e le caratteristiche. A causa della depressione della trachea che si localizza a livello dell'ingresso in torace della trachea, spesso le secrezioni possono essere presenti soltanto a questo livello, ma nei casi gravi possono evidenziate lungo il decorso di tutta la trachea. Anche la presenza di sangue dovrebbe essere registrata e quantificata mediante un punteggio (Marlin, 2003).

La presenza di edema dovrebbe essere quantificata valutando lo spessore della biforcazione tracheale e della divisione dei grossi bronchi che appariranno ispessiti e

arrotondati. Il broncospasmo può essere valutato durante l'esame broncoscopico ed è caratterizzato dalla protrusione degli anelli tracheali nel lume delle vie aeree con conseguente riduzione del diametro delle vie aeree.

Naturalmente, poiché la valutazione endoscopica delle vie aeree è un esame soggettivo, dovrebbe essere effettuato da un operatore esperto. Per questo motivo sono stati sviluppati dei sistemi semi-quantitativi a punteggio per standardizzare i rilievi ottenuti (Hare et al., 1994; Hare e Viel, 1998).

E' importante anche ricordare che l'utilità del BAL è in relazione al fatto che con esso si indagano patologie diffuse a tutto il polmone e non localizzate come ad esempio un ascesso. Inoltre la comparazione tra l'esame citologico del polmone sinistro e destro ha evidenziato che non esiste differenza tra l'uno e l'altro (McGorum et al., 1993a). In alcuni casi è necessario lavare particolari siti polmonari, come ad esempio i settori cranio-ventrali se sospettiamo una polmonite *ab ingestis* o i settori caudo-dorsali se si sospetta una EIPH.

Al fine di ampliare la valutazione delle vie aeree profonde può essere utile ricorrere nella stessa seduta alla raccolta sia del BAL che del TW per la valutazione citologica delle vie profonde e per l'esecuzione dell'esame batteriologico.

Sedazione

Il BAL viene effettuato in stazione quadrupedale su un animale sedato. La sedazione viene ottenuta mediante somministrazione di $\alpha 2$ -agonisti come xilazina cloridrato (0,3-0,5 mg/kg, IV) o detomidina (0,03-0,05 mg/kg, IV). La concomitante somministrazione di butorfanolo tartarato (0,01-0,03 mg/kg pc, IV) è spesso utile in soggetti con COPD grave ed ipersensibilità marcata, al fine di ridurre gli accessi di tosse secondari al passaggio dell'endoscopio. Viene raccomandato anche l'utilizzo di un torcinaso, particolarmente durante il passaggio dell'endoscopio nel naso-faringe.

Tecnica alla cieca

(Fogarty, 1990; McKane e Rose, 1993; Taylor e Hillyer, 1997; Hoffman e Viel, 1997; Hodgson e Hodgson, 2003; Roy e Lavoie, 2003; Rush e Mair, 2004).

Per questa metodica viene utilizzato un tubo naso-tracheale flessibile e cuffiato con diametro esterno di 9 mm fornisce risultati simili a quelli ottenuti con l'endoscopio. Il tubo viene fatto passare attraverso il naso-faringe estendendo la testa del cavallo, in modo da far passare facilmente il tubo attraverso il laringe in trachea. Un colpo di tosse suggerisce che il tubo è arrivato alla biforcazione tracheale e quindi ha stimolato i recettori della tosse; anche in questo caso viene iniettata lidocaina allo 0,4% (60-120 ml). Quindi il tubo viene fatto avanzare finché non si avverte una resistenza che indica che il diametro esterno del tubo è equivalente al diametro del bronco. Nella maggior parte dei casi, il tubo procede naturalmente nelle zone caudo-dorsali. La cuffia viene insufflata con 5-10 ml di aria; questa previene la fuoriuscita del liquido iniettato. Come per la tecnica endoscopica, vengono infusi 200-300 ml (max 500 ml) di soluzione salina sterile riscaldata utilizzando 5 siringhe da 60 ml. Si dovrebbero instillare 120 ml di soluzione fisiologica, quindi aspirare, instillare la seconda aliquota di 120 ml ed infine aspirare. Le aliquote vengono poi miscelate per costituire un unico campione.

Tecnica endoscopica

(Taylor e Hillyer, 1997; Hoffman e Viel, 1997; Viel e Hewson, 2003; Roy e Lavoie, 2003; Rush e Mair, 2004)

Dopo aver applicato un torcinaso ed aver pulito le narici da eventuale materiale organico contaminante si fa passare l'endoscopio attraverso il meato ventrale della narice destra o sinistra, si oltrepassa il laringe e si entra in trachea. Quindi si fa passare un catetere (7-8 F per colonscopio) nel canale di servizio dell'endoscopio. Il catetere viene inserito in questo momento perché quando si raggiunge il laringe e si entra in trachea, è possibile avere qualche colpo di tosse. Di solito un soggetto sano tossisce 2-3 volte durante il passaggio dell'endoscopio in laringe, e in ogni caso il riflesso si attenua dopo 5-10 secondi. Al contrario soggetti affetti da RAO, in modo

particolare, ma anche soggetti con infiammazione alle vie respiratorie (IAD) possono presentare accessi di tosse più prolungati. In questo caso, attraverso il catetere precedentemente posizionato, è possibile iniettare lidocaina per uso locale (lidocaina senza adrenalina diluita allo 0.4% in soluzione fisiologica sterile); il riflesso tussigeno viene così attenuato e nell'arco di pochi secondi (30 secondi circa) è possibile proseguire con l'introduzione dell'endoscopio. Alcuni Autori (Hewson e Viel, 2002) sconsigliano l'uso di anestetico locale a livello della giunzione laringo-tracheale perché il liquido potrebbe fluire attraverso la trachea e lavare le basse vie prima che si sia raccolto il campione per la batteriologia o per la citologia.

Quindi si percorre la trachea sino alla biforcazione, si entra (dx o sx) e si segue l'albero bronchiale finché il diametro dell'endoscopio lo permette. Anche a questo livello, poiché l'attraversamento della biforcazione tracheale può provocare tosse, è opportuno infondere anestetico topico (lidocaina senza adrenalina diluita allo 0,4% in soluzione sterile). L'endoscopio viene fatto procedere fino ad un bronco segmentale: lo strumento deve essere inserito finché non si avverte una resistenza che indica che il diametro esterno dell'endoscopio è uguale al diametro del bronco. Questo è molto importante perché è necessario che l'endoscopio stesso occluda il bronco per evitare che il fluido instillato venga disperso. Bisogna ricordare che l'area di polmone che viene lavata e quindi indagata è in relazione al diametro esterno dell'endoscopio; strumenti di diametro di 10-13 mm generalmente riescono ad occludere bronchi di IV o VI generazione. In questo caso saremo in grado di lavare un numero significativo di bronchi ad alveoli (Hewson e Viel, 2002).

Una volta che l'endoscopio o il tubo sono posizionati, si può procedere al BAL. Questo viene effettuato con soluzione fisiologica 0.9%, a 37°C per evitare il broncospasmo indotto dall'uso di soluzione a temperatura più bassa. Il fluido può essere instillato direttamente attraverso il canale di servizio dell'endoscopio oppure è possibile utilizzare un catetere che viene fatto passare nel canale di servizio dello strumento e quindi il liquido passa attraverso il catetere.

Si iniettano 300 ml di soluzione salina sterile a 37°C e si aspira una volta svuotata l'ultima siringa.. Data l'elevata capacità di assorbimento dell'albero respiratorio è importante aspirare immediatamente la soluzione fisiologica iniettata perché altrimenti potrebbe venirne persa una buona quantità. Il recupero del lavaggio bronco-alveolare può essere eseguito manualmente o meccanicamente mediante un aspiratore, fissato ad una pressione tra -5 e -15 cm H₂O. L'uso di una pressione

negativa maggiore può causare il collasso del bronco sito di campionamento e quindi un trauma dell'epitelio bronchiolo-alveolare, ne consegue il recupero di un campione di scarso volume ed una sua possibile contaminazione iatrogena con emazie (Sweeney et al, 1994). Il recupero di un campione di scarso volume è più rappresentativo di un lavaggio bronchiale con una maggiore percentuale di linfociti e privo di cellule del tratto alveolare. E' possibile raccogliere fino al 75% della soluzione iniettata, ma in alcuni casi, quali per esempio ostruzione delle vie aeree causate da edema o da broncospasmo vengono recuperate quantità inferiori per la riduzione del lume del bronco durante la fase di aspirazione del campione.

Ai fini della valutazione dell'avvenuto campionamento dalle vie alveolari è importante determinare la presenza di schiuma sulla superficie del campione, questo indica la presenza di surfactante alveolare e che quindi la soluzione fisiologica ha raggiunto gli alveoli e verosimilmente raccolto le cellule presenti sull'epitelio alveolare.

Complicazioni

Il liquido viene raccolto con siringhe da 60 ml, cercando di non applicare una eccessiva pressione negativa; questo è necessario per evitare il collasso delle vie aeree e traumi dell'epitelio che esitano inevitabilmente con contaminazioni iatrogene di eritrociti del BAL.

Il volume di liquido iniettato influenza la conta cellulare totale e differenziale. Un volume ridotto di liquido è generalmente causa di raccolta di cellule bronchi ma non dagli alveoli con un aumento della percentuale dei neutrofili. Volumi maggiori di liquido permettono di raccogliere campioni più rappresentativi di cellule alveolari (Sweeney et al., 1994). Volumi maggiori di liquido permettono di raccogliere campioni più rappresentativi di cellule alveolari (Sweeney et al., 1994). Allo stato attuale delle conoscenze viene raccomandato l'uso volumi di 250-500 ml (Robinson, 2001).

Le complicazioni del BAL sono minime. Quarantotto ore dopo la procedura è possibile rilevare una risposta infiammatoria di tipo neutrofilico a livello della porzione di polmone lavato. Questa risposta è però limitata al bronco e segmento di polmone lavato e non coinvolge quelli adiacenti ed il polmone controlaterale

(Sweeney et al., 1994). Rialzi modesti della temperatura rettale sono stati osservati entro 24 ore dalla procedura, senza effetti clinici. Nei casi di piressia elevata o persistente associati a sintomi generici quali depressione del sensorio e anoressia deve essere valutata l'ipotesi di disseminazione di una preesistente infezione. Per questo motivo è necessario avvisare i proprietari di monitorare l'appetito, la temperatura rettale e l'eventuale deterioramento della funzionalità respiratoria nelle 24 ore post-lavaggio (Hewson e Viel, 2002).

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL BALF

Il BALF deve essere raccolto in provette con EDTA per l'esame citologico e in provette da siero o in tamponi con terreno di trasporto per l'esame batteriologico.

Ad oggi non sono descritte delle linee guida univoche per quanto riguarda i metodi di conservazione di campioni di BALF prima della loro analisi. Una conservazione inadeguata dei campioni porta all'alterazione della vitalità delle cellule e/o ad una proliferazione dei microrganismi presenti e può quindi condizionare l'interpretazione del preparato citologico e dell'esame batteriologico. I fattori che maggiormente determinano tali alterazioni sono il tempo, la temperatura e l'uso di fissativi.

Secondo uno studio eseguito nel 2002 (Pickles et al., 2002a) si evidenzia che le cellule sopravvivono più a lungo a temperature inferiori e quella di refrigerazione è la temperatura ottimale per la conservazione di materiale cellulare. In particolare lo studio conferma che si ha una riduzione della conta totale cellulare in relazione al tempo. La morfologia cellulare, infatti, si degrada dopo 24h a 4°C, dopo 8h a 18°C e dopo 4h a 38°C.

Una possibilità per evitare questi fenomeni di alterazione cellulare è quella di ricorrere a fissativi, i quali non devono indurre modificazioni della morfologia cellulare. I fissativi possono essere a base alcolica o a base di formalina. Secondo Pickles et al. (2002a) il fissativo a base di formalina causa un aumento significativo della componente linfocitaria e questo sembra essere dovuto ad un errore di lettura del contaglobuli indotto dal fissativo che modifica l'aspetto delle altre cellule infiammatorie, ed in particolare dei neutrofili, rendendole più piccole e di colore scuro e in definitiva più simili ai linfociti.

Un altro fissativo potrebbe essere l'etanolo al 40% da aggiungere nella proporzione di 1:1 al campione subito dopo il prelievo. Questo fissativo blocca la sovra-crescita batterica, ma è sconsigliato per le alterazioni morfologiche cellulari che provoca (McGorum et al., 1994; Pickles et al., 2002a).

Anche la presenza di microrganismi nel campione di BALF può essere influenzata dal metodo di conservazione in relazione al tempo e alla temperatura. I campioni di BALF destinati all'esame colturale dovrebbero essere seminati nel più breve tempo possibile. Intervalli di tempo superiori alle 24 ore tra il recupero del BALF e la semina del campione per l'esame batteriologico escludono la possibilità di avere

risultati attendibili. Campioni non refrigerati sono a rischio di una rapida sovra-crescita sia di batteri patogeni che di contaminanti, mentre i batteri strettamente anaerobi difficilmente sopravvivono a temperature di refrigerazione. All'aumentare della temperatura si ha una riduzione del tempo necessario per osservare una importante sovra-crescita batterica nel campione raccolto. Infatti, già dopo 8h a 18° si verifica un aumento del numero di microrganismi nel campione raccolto, mentre a temperatura di refrigerazione (4°C), la sovracrescita non si verifica fino a 24h dalla raccolta (Pickles et al., 2002a). Nel caso in cui sia necessario conservare il campione refrigerato di BALF per un periodo superiore alle 24 h, è preferibile in ogni caso aggiungere un fissativo al fine di preservare la morfologia cellulare e prevenire la crescita batterica.

Oltre la sovracrescita batterica, altre cause che precludono l'attendibilità dell'esame batteriologico sono la disidratazione e l'esposizione ad agenti atmosferici. L'idratazione può essere mantenuta ponendo il campione di BALF su un tampone sterile e conservandolo poi in soluzione salina sterile. Questo tipo di mezzo di trasporto è molto povero di nutrienti e quindi la sovra-crescita batterica rimane molto limitata.

Gli agenti atmosferici quali l'ossigeno e la temperatura di refrigerazione sono nocivi per la conservazione, per esempio, di batteri anaerobi stretti. In questo caso è utile conservare il BALF in terreno di trasporto specifici per anaerobi e mantenuto a temperatura ambiente.

E' comunque necessario ricordare che la sovracrescita batterica avviene sempre, anche se in minor misura se il campione è conservato refrigerato e/o in terreno di trasporto, quindi questo aspetto deve essere tenuto in considerazione nell'interpretazione dei risultati relativi all'esame batteriologico.

ALLESTIMENTO DEL PREPARATO CITOLOGICO

La condizione ideale è che il preparato citologico venga approntato il prima possibile dopo la raccolta del campione di BALF. Il preparato citologico può essere allestito direttamente dal campione di BALF mediante striscio, dopo centrifugazione oppure dopo citocentrifugazione.

Lo striscio allestito direttamente dal BALF è una tecnica di semplice esecuzione e fattibile anche in campo e di basso costo. Come in ematologia, lo striscio si esegue disponendo 5µl di sospensione cellulare su di un vetrino e strisciata mediante un secondo vetrino posto a 45° rispetto al primo e ai bordi della sospensione stessa. La sospensione cellulare si ottiene dopo centrifugazione del campione di BALF, eliminazione del surnatante e sospensione del tappo di cellule con 1-2 gocce di soluzione fisiologica. La preparazione diretta dal campione di BALF presenta alcune problematiche legate alla combinazione di una minor quantità di proteine e di cellule, che possono causare una riduzione della qualità del preparato citologico. Infatti, se si ricorre a questa tecnica o alle tecniche che normalmente si utilizzano per la preparazione di vetrini da campioni ematici, si verifica una distruzione delle cellule presenti nel campione a causa della scarsa quantità di proteine. E' quindi necessario utilizzare metodi che permettano un aumento della cellularità e preservino l'integrità cellulare. Una metodica che permette di concentrare la quantità di cellule senza comprometterne l'integrità è la centrifugazione. Essa si esegue a bassi giri (600-800 minuti) per 5 minuti. Il surnatante deve essere delicatamente rovesciato e le cellule risospese aggiungendo 1 o 2 gocce di soluzione fisiologica, quindi il deposito che rimane al fondo della provetta viene raccolto con una pipetta e viene strisciato su di un vetrino portaoggetto (Zinkl, 2002).

Oggi la metodica più diffusa per allestire un preparato citologico da un campione di BALF è la citocentrifugazione, la quale permette di depositare, su un'area centrale e definita del vetrino, su un monostrato cellulare uniforme. Anche se non sono descritti dei protocolli standardizzati, alcuni autori indicano che la centrifugazione debba avvenire a bassa velocità (300 rpm) per 3 minuti, utilizzando una frazione di 100 µl del campione di BALF. La frazione di 100 µl si ottiene dopo centrifugazione a 1300 rpm per 6 minuti del campione di BALF; il surnatante viene rovesciato delicatamente e quindi vengono aggiunti 0.2-0.4 ml di siero equino (Pickles et al., 2002b).

I limiti di questa tecnica sono la difficoltà di applicazione in campo, l'accumulo in un'area limitata di molto muco e detriti cellulari che possono mascherare all'osservazione al microscopio soprattutto i linfociti ed alterarne anche la morfologia, falsandone quindi la lettura differenziale (Lapointe et al., 1994).

Mettendo a confronto la citocentrifugazione con l'allestimento mediante striscio direttamente dal BALF, esistono differenze relative alla morfologia cellulare che influiscono sulla valutazione della conta differenziale. La citocentrifugazione permette di avere una qualità del vetrino eccellente e una morfologia cellulare perfettamente conservata, rendendo l'identificazione delle cellule molto facile. Al contrario se la qualità dello striscio è inferiore: le cellule appaiono più piccole, di una colorazione più scura e di aspetto tridimensionale, il che rende la loro identificazione più difficile. Il preparato citocentrifugato però porta alla lettura di una percentuale inferiore di linfociti rispetto allo striscio tal quale, mentre i macrofagi risultano in numero più elevato. Alcuni Autori (Mordelet-Dambrine et al., 1984; Fleury-Feith et al., 1987) ritengono che i linfociti abbiano capacità adesive al vetrino portaoggetto inferiori rispetto ai macrofagi e quindi non vi rimangano adesi. Altri Autori, invece, hanno supposto una maggiore lisi dei linfociti durante la centrifugazione (Saltini et al., 1984; Fleury-Feith et al., 1987) legata alla velocità applicata. Quindi Willcox et al. (1988) suggeriscono di applicare alte velocità per brevi periodi di tempo.

D'altro canto la valutazione dei linfociti in un preparato citologico ottenuto con striscio può essere erroneamente sovrastimata a causa dell'aspetto più coartato e scuro che altre linee cellulari assumono durante l'allestimento del preparato e che ne falsano la lettura.

Per quanto riguarda i neutrofili non esistono differenze significative della loro lettura con entrambe le tecniche. Questo dato indica che l'esame citologico mediante striscio fornisce risultati attendibili e quindi diagnostici in corso di neutrofilia polmonare. Infatti i neutrofili, pur essendo di dimensioni più ridotte e di colore più scuro rispetto a quelli osservabili da un preparato mediante citocentrifugazione, non perdono il tipico aspetto segmentato del nucleo.

Infine, anche gli eosinofili sono facilmente identificabili con entrambe le metodiche, grazie alla presenza dei loro caratteristici granuli.

Esistono diverse metodiche di preparazione di un citologico per ottenere una stima accurata dei linfociti (Saltini et al., 1984; Laviolette et al., 1988; Nicholls e Pirie, 2001). Alcuni Autori consigliano di approntare un preparato con Cytospin ed uno

con centrifugazione classica, al fine di confrontare i risultati delle due conte cellulari (Hewson e Viel, 2002).

Ogni preparato citologico deve essere asciugato all'aria il più rapidamente possibile per prevenire le alterazioni nella morfologia cellulare e di seguito colorato.

Sia i preparati ottenuti con Cytospin che quelli ottenuti con centrifugazione classica possono essere colorati con colorazione Romanowsky, Diff-Quick o Romanowsky modificato, Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa. Colorazioni particolari da utilizzare sono il Blu di Prussia per l'identificazione degli emosiderofagi, la colorazione di Leishmann e il Blu di Toluidina per i mastociti (Hewson e Viel, 2002; Di Fabio et al., 2003; Leclere et al., 2006), la colorazione di Gram permette di differenziare macrofagi immaturi da linfociti di grosse dimensioni.

In uno studio di Leclere et al. (2006) sono stati messi a confronto la colorazione di Romanowsky rapida (Fast-R), la colorazione automatica con coloranti tipo Romanowsky, il May-Grunwald Giemsa ed il Blu di Toluidina al fine di valutare la metodica migliore per mettere in evidenza la capacità metacromatica dei mastociti. Il Blu di Toluidina è risultato il metodo migliore per il rilievo dei mastociti, ma con l'inconveniente di non poter contare le altre cellule che con questa colorazione non possono essere visualizzate. Il metodo di Romanowsky rapido è risultato inadeguato per la colorazione dei mastociti, mentre il metodo Romanosky in automatico ed il May-Grunwald-Giemsa hanno mostrato pari capacità di mettere in evidenza i granuli metacromatici dei mastociti.

I problemi che si possono verificare durante la fase di colorazione dei vetrini sono legati a una colorazione insufficiente o alla formazione di precipitati. Nel caso di una colorazione insufficiente possono essere osservati i granuli eosinofili di colore rosso brillante e i nuclei dei leucociti di colore blu invece di viola. La formazione di precipitati, di aspetto sferico o reticolare, possono mascherare alcuni dettagli cellulari e ne rende difficile il riconoscimento. Questo problema si verifica spesso con l'utilizzo delle colorazioni Diff-Quick e Wright. Le cause possono essere legate a un risciacquo insufficiente del vetrino dopo colorazione o alla evaporazione del colorante (Zinkl, 2002).

VALUTAZIONE MACROSCOPICA DEL PREPARATO CITOLOGICO

L'aspetto dei campioni di BALF deve essere valutato per alcune caratteristiche macroscopiche, quali la torbidità come indice della presenza di muco, il colore, l'odore.

Muco

Nei soggetti sani, il BALF (Bronco Alveolar Lavage Fluid) è chiaro o lievemente torbido e sulla superficie è possibile osservare della schiuma bianca che è costituita dal surfactante prelevato.

L'aumento della torbidità di un campione di BALF è un indice dell'aumentata produzione di muco e di desquamazione cellulare delle vie aeree profonde. La valutazione del contenuto di muco del campione di BALF è tuttavia più accurata se si mette in relazione alla quantità di muco visibile all'esame endoscopico delle vie aeree profonde. In soggetti sani, le vie aeree profonde contengono solo tracce di materiale mucoso o ne sono del tutto prive perché nei cavalli il meccanismo di clearance muco-ciliare è efficiente e l'eliminazione di muco pareggia la sua produzione (Withwell e Greet, 1984).

Se è presente muco visibile all'esame endoscopico è consigliabile l'esecuzione del BAL e la valutazione citologica del fluido refluo per interpretare correttamente il fenomeno. Ad esempio, soggetti con una storia di tosse cronica possono mostrare una produzione di muco abbondante, di aspetto denso e di colore opaco-biancastro, che può suggerire la presenza di una bronchite settica. In questi soggetti, la citologia del BALF può confermare un processo settico oppure escluderlo sulla base della presenza di macrofagi attivati circondati da abbondante materiale mucoso e uno scarso numero di batteri, generalmente non patogeni (Beech, 1991).

Una classificazione endoscopica oggettiva della quantità di muco accumulato lungo le vie aeree è stata descritta da diversi Autori mediante l'uso di uno *score* clinico da 0 a 3 (Dixon et al., 1995) o da 0 a 5 secondo Altri (Holcombe et al., 2001; Gerber et al., 2004). La letteratura specialistica a questo proposito non indica come quantificare la presenza del muco nel liquido e sul preparato citologico. Sul preparato citologico viene colorata la componente proteica del muco e si possono quindi

osservare ampie striature di colore rosa-violetto. A volte è possibile osservare anche spirali di colore eosinofilo scuro, chiamate spirali di Curschmann, che rappresentano l'impronta del muco a livello bronchiolare. Generalmente questo tipo di reperto si rileva in soggetti che presentano una prolungata ed eccessiva produzione di muco associata a broncospasmo.

Colore

Il BALF raccolto in soggetti sani non è colorato, ma in condizioni patologiche può cambiare in base alla presenza di elementi cellulari o sostanze libere. Talvolta il colore può anche indirizzare verso un'ipotesi diagnostica. Un aspetto lattescente del BALF, per l'elevato numero di leucociti è suggestivo di una flogosi settica, mentre i campioni ottenuti da soggetti con EIPH possono essere da rosati a rossi, in base al numero di GR o emoglobina libera presenti nel BALF. Il campione è francamente rosso quando il numero di emazie è superiore a 13.000 per microlitro. Il materiale flocculento in sospensione è costituito da muco e/o detriti cellulari (Hodgson e Hodgson, 2007).

Odore

Un campione di BALF raccolto da soggetti sani è inodore, mentre un odore putrido può essere associato ad un'infezione di tipo anaerobio o a necrosi del parenchima polmonare (Hodgson e Hodgson, 2007).

CONTA CELLULARE TOTALE

La quantificazione del numero totale di cellule/ μ l è un indice del numero complessivo di cellule presenti in un campione. Tuttavia molti fattori possono influenzare l'accuratezza di questa misurazione e, in particolar modo, da campioni di BALF si può ottenere solo una stima della conta cellulare perché il lavaggio con soluzione salina determina inevitabilmente una diluizione della cellularità del campione. La diluizione stessa, a sua volta, può variare in base alla quantità di soluzione salina iniettata, da quella recuperata e ancora dalle condizioni delle vie aeree (Sweeney et al., 1994; Hodgson e Hodgson, 2007).

Sono state tentate strategie per valutare l'entità della diluizione del campione, come la tecnica della concentrazione dell'urea, tuttavia questo valore può aumentare significativamente nel caso di un processo infiammatorio polmonare. Alcuni Autori hanno studiato l'utilizzo della valutazione delle proteine totali (PT) del BALF, ma questo esame non sembra essere di utilità perché la concentrazione delle PT nel liquido refluo è molto bassa (Zinkl, 2002).

Un altro fattore che influenza la conta cellulare è la presenza di muco che imprigiona le cellule. Alcuni Autori hanno proposto la filtrazione del campione di BALF, ma questo accorgimento non sembra migliorare l'accuratezza della lettura perché è possibile avere una sottostima della reale entità delle cellule presenti (Mordelet-Dambrine et al., 1984; Lam et al., 1985; Willcox et al., 1988; Nicholls e Pirie, 2001). La filtrazione, infatti, causa la perdita di specifiche popolazioni cellulari, quali cellule epiteliali, macrofagi e mastociti (Hewson & Viel, 2002).

Un altro fattore da prendere in considerazione sono le dimensioni cellulari che possono essere maggiori rispetto alla calibrazione dello strumento. Per quanto riguarda il BALF, il range di riferimento della conta cellulare è $<10^9$ cellule/ μ l. Le alterazioni della lettura dei WBC totali possono essere ovviate utilizzando una tecnica standardizzata in cui si utilizzi un sito di campionamento costante e si recuperi una percentuale pari al 40-60% della soluzione fisiologica iniettata (Hewson & Viel 2002).

I risultati relativi ai WBC totali devono essere comunque interpretati criticamente, perché lo strumento potrebbe non contare tutti gli elementi cellulari escludendo

quelli di maggiori dimensioni e trascurando tutti quelli intrappolati dal muco (Crystal et al., 1986).

CONTA CELLULARE DIFFERENZIALE

La valutazione dell'esame citologico richiede la conoscenza delle cellule normalmente presenti nell'apparato respiratorio e della loro morfologia. Inoltre la determinazione delle proporzioni delle varie popolazioni cellulari consente una corretta interpretazione di eventuali modificazioni patologiche. L'accuratezza dell'interpretazione del preparato citologico varia in base al metodo di raccolta del campione e la tecnica utilizzata per la preparazione del vetrino.

Molti studi hanno evidenziato che esiste una differenza tra le popolazioni cellulari presenti nel TW e nel BAL (Derksen et al., 1989; Hodgson e Hodgson, 2003; Allen et al., 2006).

Nel prelievo tracheale le cellule epiteliali ed i neutrofili sono più rappresentati rispetto al BAL. Le cellule epiteliali respiratorie sono presenti nel TW in misura diversa in relazione al grado di trauma subito dall'epitelio durante la procedura di raccolta; allo stesso modo, i neutrofili sono presenti sempre in percentuale maggiore nel TW rispetto al BAL anche nei soggetti sani (Hewson e Viel, 2002).

Non esiste una correlazione tra la popolazione cellulare del TW con quella del BAL, né con i rilievi istopatologici *post-mortem* (Larson e Busch, 1985; Hodgson e Hodgson, 2003; Allen et al., 2006). Esiste invece una correlazione positiva e statisticamente significativa tra la popolazione cellulare del BAL con i rilievi istopatologici (Fogarty, 1990).

La valutazione citologica del BALF è considerata il metodo più sensibile per la valutazione dello stato infiammatorio delle vie respiratorie profonde. Eccezione a questo sono le broncopolmoniti batteriche dove le cellule presenti nel lavaggio tracheale rappresentano più fedelmente il quadro patologico perché l'endoscopia può non permettere di individuare il bronco distrettuale del parenchima polmonare affetto dall'infezione. Alcuni Autori, infatti, hanno evidenziato che soggetti con pleuropolmonite diagnosticata possono avere anche una citologia negativa al BAL (Rossier et al., 1991).

L'interpretazione dell'esame citologico consiste non solo nel riconoscimento degli elementi cellulari, ma anche nel loro conteggio percentuale. Per questo scopo devono essere contate almeno 200-300 cellule, considerando di osservare il preparato in tutti i campi perché la distribuzione cellulare potrebbe non essere omogenea, in

particolare se presente molto muco con cellule intrappolate (Hodgson e Hodgson, 2007).

L'esame microscopico deve essere eseguito inizialmente a basso ingrandimento (20X) per individuare la presenza di aree disomogenee sul preparato allo scopo di considerare solo quelle rappresentative. Per esempio nel caso di agglomerati di muco che intrappolano le cellule può essere molto difficoltosa la loro identificazione e la conta differenziale. Una volta ottenuta una visione d'insieme del vetrino si procede alla conta cellulare differenziale ad immersione (100X). La lettura del preparato ad immersione permette una migliore identificazione delle caratteristiche morfologiche di ciascuna linea cellulare e la presenza di batteri (Hewson e Viel, 2002).

ELEMENTI CELLULARI E NON CELLULARI PRESENTI NEL BALF

Cellule infiammatorie

Le cellule presenti normalmente nelle porzioni bronco-alveolari sono macrofagi, linfociti, e in minor misura neutrofili, eosinofili e mastociti. La popolazione cellulare rimane qualitativamente la medesima in soggetti sani e malati, ma variano le loro percentuali. I limiti di riferimento approssimativi sono stati identificati da vari Autori (tab. 1).

N animali	RAZZA	ETA'	Mac (%)	Linf (%)	PMN (%)	EO (%)	MC (%)	Autori
6	Stb	2.7±1.1	64±5	28±3	4±0.3	1±1	0.3±0.3	Moore, 1995
12	Stb	3.1±0.9	60±5	37±5	2±1	0.03±0.1	0.4±0.4	Hare et al, 1994
6	Stb	3.5±1	68*	32*	0.4*	0.3*	1*	Hare, 1998
11	Tb	3.2±1.2	65±6	28±6	7±3	0	0.2±0.7	Fogarty, 1991
7	Stb/Tb	4.3	40-70%	30-60%	<5%	<0.5%	<2%	Ferrucci et al., 2000
11	-	-	60.1±1.4	36.7±1.6	2.2±0.4	0.03±0.03	0.4±0.1	Viel, 1997 a,b
-	-	-	30-60%	30-70%	<5%	-	-	Moore, 1996
-	-	-	30-60%	30-70%	<5%	Occasional	Rari	Rush e Mair, 2004

Tabella 1 - Valori ottenuti in soggetti sani.

Legenda – Mac: Macrofagi; Linf: Linfociti; PMN: Neutrofili; EO: Eosinofili; MC: Mast-Cell; Stb: Standardbred; Tb: Thoroughbred; DS: Deviazione Standard; *: dati espressi come valori medi.

Muco

Il materiale che si ottiene dal lavaggio delle basse vie aeree contiene sempre una quantità variabile di muco (Zinkl, 2002). La presenza di muco all'interno del

campione di BALF gli conferisce un aspetto torbido e quando questo è presente in quantità maggiori si possono osservare filamenti e flocculi biancastri. Sul preparato citologico viene colorata la componente proteica del muco e si possono quindi osservare ampie striature di colore rosa-violetto. A volte è possibile osservare anche delle spirali di colore scuro, chiamate spirali di Curschmann, che rappresentano lo stampo del muco a livello bronchiolare. Generalmente questo tipo reperto si trova in soggetti che presentano una prolungata ed eccessiva produzione di muco associata broncospasmo e ridotta attività mucociliare (Bain, 1997; Hodgson e Hodgson, 2007 et al., 2007).

Cellule epiteliali

(Bain, 1997; Zinkl, 2002)

Le cellule epiteliali sono osservabili sono: cellule dell'epitelio ciliato colonnare, cellule non ciliate di vario tipo e cellule globose. Le cellule dell'epitelio ciliato colonnare sono allungate con *cilia* fini all'estremità opposta del nucleo. Le cellule globose sono di aspetto simile alle precedenti, ma non presentano *cilia* e possono contenere granuli mucosi al loro interno. Frequentemente possono essere osservati gruppi di cellule epiteliali basofile che vengono asportate durante processi infiammatori multifocali nel contesto di flogosi generalizzate. Nel caso del TW sono normalmente presenti un certo numero di cellule squamose provenienti dall'orofaringe che appaiono come moderatamente basofile, di aspetto largo, appiattito o ripiegato e molte di queste hanno batteri adesi alla loro superficie. La loro presenza indica il naturale allontanamento dei batteri commensali o più di rado di contaminazione attraverso il fisiologico rinnovo della mucosa respiratoria, pertanto il risultato dell'esame batteriologico dovrebbe essere interpretato alla luce del genere di batterio isolato e del processo infiammatorio rilevato (Viel et al., 1999). La presenza di eritrociti può essere causata da microtraumi durante l'esecuzione del BAL, da processi infiammatori o da emorragia polmonare indotta dallo sforzo (EIPH).

Materiale estraneo all'apparato respiratorio

(Zinkl, 2002)

Il rilievo di materiale estraneo all'apparato respiratorio è secondario ad inalazione di materiale che non è stato poi espettorato dall'attività muco-ciliare dell'epitelio respiratorio o alla contaminazione del BAL durante l'esecuzione dell'endoscopia.

I batteri possono essere sia commensali che di contaminazione provenienti dalle alte vie aeree, dal cavo orale o ambientali. In questo caso il significato della presenza di batteri può essere interpretato correttamente sulla base dell'esame citologico e della sintomatologia. Ad esempio la presenza di *Simonsiella* spp. conferma la contaminazione del campione con materiale proveniente dall'oro-faringe dove questo tipo di batterio è presente.

Infine altri materiali contaminanti di frequente osservazione sono pollini, ife o spore, frammenti vegetali, strutture cristalline libere o contenute all'interno dei macrofagi.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CONTA DIFFERENZIALE

L'utilizzo di piccole quantità di soluzione fisiologica (50 ml) è stata associata alla conta di percentuali elevate di neutrofili e ridotte percentuali di mastociti, rispetto all'uso di quantità maggiori (300 ml) (Sweeney et al., 1994).

Questo risultato suggerisce che scarsi volumi di BALF sono rappresentativi di un lavaggio bronchiale più che broncoalveolare. E' necessario quindi ricorrere all'inoculazione di volumi elevati per ottenere un lavaggio delle vie aeree più profonde e quindi anche alveolare (Sweeney e Beech, 1991).

Alcuni Autori hanno messo a confronto i risultati della citologia di campioni di BALF ottenuti mediante 3 lavaggi consecutivi con un volume di 100 ml di soluzione fisiologica, rispetto ai risultati ottenuti da un unico lavaggio con 300 ml. Se inizialmente non sono emerse differenze tra le tre aliquote (Mair et al., 1987), successivamente è stato osservato che un lavaggio sequenziale delle basse vie aeree favorisce un aumento del volume di BALF recuperato e anche un aumento della componente dei macrofagi (Sweeney et al, 1992).

La quantità di soluzione fisiologica iniettata e il volume di BALF recuperato sono quindi due punti critici nell'esecuzione del BAL, che possono influenzare i risultati dell'esame citologico. Pickles et al. (2002c) ha affrontato questo punto mettendo a confronto la citologia ottenuta da aliquote sequenziali (100 ml ciascuna) tra loro e con un loro pool. L'ipotesi dell'autore è che ciascun lavaggio rimuove le cellule dal tratto bronchiale e le sospinge più in profondità verso lo spazio bronco-alveolare. All'esame citologico sono stati presi in considerazione la Conta Cellulare Totale e la Conta Cellulare Differenziale delle popolazioni dei neutrofili, macrofagi, linfociti ed eosinofili. Dallo studio emerge che non ci sono differenze significative tra le aliquote per quanto riguarda la Conta Cellulare Totale ed essa è risultata in media superiore a 300 cell/ul. Questo dato confermerebbe l'ipotesi che lavaggi sequenziali determinano uno scivolamento delle cellule verso zone più profonde dell'albero respiratorio e quindi una maggiore cellularità del campione di BALF. Il risultato di Pickles et al. (2002c) è confermato anche da un lavoro precedente in cui è stato dimostrato che l'utilizzo di 300 ml in unica infusione fa ottenere un numero inferiore di cellule alla conta cellulare totale (<300 cell/ul) (Sweeney e Beech, 1991).

Anche la percentuale di neutrofili non varia tra le 3 aliquote e il loro pool, quindi ciascuna aliquota è da considerarsi rappresentativa della reale percentuale dei neutrofili del campione raccolto. Questo dato è importante poiché in soggetti affetti da RAO, a causa del broncospasmo, si ottengono generalmente scarsi volumi di BALF, quindi anche piccole quantità di BALF (20 ml) possono avere un valore diagnostico di una flogosi neutrofilica, tipica della RAO.

La conta differenziale ottenuta per i macrofagi e i linfociti risulta, invece, diversa tra le tre aliquote e il pool. I macrofagi aumentano nelle ultime aliquote, mentre i linfociti hanno un andamento inverso. Questo risultato confermerebbe che si può ottenere un BALF effettivamente rappresentativo di un lavaggio dello spazio bronco-alveolari ricorrendo a volumi cospicui non inferiori a 300 ml.

L'ESAME BATTERIOLOGICO

Tutti i metodi considerati per il prelievo offrono vantaggi e svantaggi e le secrezioni ottenute da cavalli sani permettono l'isolamento di batteri patogeni, transitori e commensali. In uno studio solo il 50% dei soggetti con esame colturale positivo aveva un quadro citologico indicante un processo infiammatorio delle vie aeree profonde (Whitwell e Greet, 1984). L'aspirato trans-tracheale, anche se ritenuta la metodica più adatta per l'esame batteriologico, può essere contaminato dai batteri commensali della pelle, quali lo *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* sp., o *Enterobacter* sp. (Sweeney et al., 1985), anche dal BAL di cavalli sani possono esser ottenute colonie batteriche con numero limitato di CFU (Fogarty e Buckley, 1991).

La presenza di squame e batteri adesi indica sempre contaminazione pertanto, in tal caso, il risultato dell'esame batteriologico dovrebbe essere ignorato (Viel et al., 1999).

Altro metodo di prelievo è quello tramite *brush* protetto, il campione ottenuto può fornire risultati specifici, ma è meno sensibile degli altri metodi di prelievo (Hoffman et al., 1993).

In particolare l'esame batteriologico dovrebbe essere eseguito soltanto nei soggetti clinicamente malati con sintomi quali febbre, abbattimento, tachipnea, rumori respiratori alterati all'auscultazione, presenza di scolo nasale, esame radiografico e/o ecografico anormali. Inoltre la positività della cultura batterica dovrebbe essere ritenuta significativa se il batterio isolato è un patogeno dell'apparato respiratorio, se si è verificata una crescita consistente e l'esame citologico rivela il quadro di un'infezione suppurativa. In altre parole ogni isolamento dovrebbe essere interpretato alla luce dell'esame clinico, radiologico, ecografico e dell'esame citologico.

La quantificazione batterica ha senso solo nei prelievi eseguiti senza infusione di soluzione fisiologica. Nel caso dei veri patogeni il batterio frequentemente cresce in cultura pura con oltre 10⁶ CFU/ml, mentre le culture miste con meno di 10⁴ CFU/ml non sono considerate rappresentative (Dixon, 1997).

Batteri più frequentemente isolati da polmone di cavallo adulto e puledro

(Hewson e Viel, 2002)

Streptococcus zooepidemicus

Actinobacillus suis

Streptococcus equi var *equuli*

Pseudomonas aeruginosa

Escherichia coli

Bordetella bronchiseptica

Streptococcus equi var *equi*

Streptococcus pneumoniae

Klebsiella pneumoniae

Pasteurella spp

Enterobacter spp

Staphylococcus aureus

Rhodococcus equi

Staphylococcus epidermidis

QUADRO CITOLOGICO IN RELAZIONE A PATOLOGIE RESPIRATORIE

Flogosi settica

(Beech et al., 1975; Whitwell e Greet, 1984; Larson e Busch, 1985; Bursh e Jensen, 1987; Jang et al., 1987; Bain, 1997)

Nel corso di un processo di tipo purulento la popolazione cellulare principale è rappresentata dai neutrofili, i quali, all'esame citologico, appaiono in grandi quantità e di aspetto degenerato con cariolisi e vacuolizzazione citoplasmatica.

E' possibile riscontrare neutrofili di aspetto degenerato in campioni di BALF anche in assenza di un processo infiammatorio di tipo settico e le cause vanno ricercate nelle modalità di stoccaggio e conservazione dei campioni. Infatti se questi vengono lasciati in provetta per un periodo di tempo eccessivamente lungo si può riscontrare vacuolizzazione, cariolisi dei neutrofili.

Quando la popolazione neutrofilica è la predominante e la sintomatologia clinica è compatibile con un infezione è consigliabile eseguire un esame batteriologico sul BALF, anche se non sono stati individuati batteri al microscopio.

Macrofagi alveolari sono numerosi nel BALF di soggetti con processo infettivo a carico delle basse vie aeree. I macrofagi sono cellule grandi con un citoplasma abbondante e lievemente basofilo. Solitamente contengono un solo nucleo, ma si possono osservare anche cellule binucleate o occasionalmente macrofagi multinucleati.

Le cellule dell'epitelio colonnare in corso di un processo infettivo purulento si riscontrano anche piccoli cluster di cellule epiteliali iperplastiche.

Quando il processo infettivo persiste, il rapporto tra neutrofili e macrofagi alveolari decresce in favore dei macrofagi. Infatti il rapporto neutrofili/macrofagi definisce la classificazione della lesione che quindi varia da neutrofilica, mista neutrofilica/mononucleare a mononucleare.

La possibilità di datare il processo infiammatorio infettivo utilizzando i risultati della citologia è difficile, ma sappiamo che la risposta ed attivazione dei macrofagi alveolari è molto veloce e precede il fenomeno purulento, che può persistere per un periodo di tempo lungo.

Attraverso l'esame citologico di questo tipo di campioni di BALF è possibile osservare la presenza di batteri coccoidi o bastoncellari che appaiono neri con colorazione Romanowsky. In un medesimo campione è possibile trovare batteri di differenti specie, i quali possono essere intracellulari o extracellulari. In particolare la presenza di batteri intracellulari è indicativa di un processo settico. Questi organismi vengono classificati in base alla loro forma, ma non è possibile determinarne la specie solamente con l'esame citologico e si possono ottenere maggiori informazioni attraverso la reazione alla colorazione di Gram.

Tra i più comuni agenti patogeni dell'apparato respiratorio del cavallo vi sono lo *Streptococcus zooepidemicus*, gram-positivo, cocco che di solito si trova come organismo singolo o in catene di due o quattro organismi. Il *Rhodococcus equi* è patogeno esclusivamente in puledri di 3-6 mesi, è gram-positivo. Batteri patogeni gram-negativi sono l'*Actinobacillus suis*, *Pasteurella* spp., i membri delle enterobatteriacee (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp.), ed infine altri batteri anaerobi quali il *Fusobacterium necrophorum*, *Bacterioides* spp., e *Clostridium* spp.

I batteri anaerobi possono presentare forme inusuali come estremità appuntite, rigonfiamenti o incurvamenti ed è importante distinguerli da altro materiale a cui possono assomigliare come granuli di muco, granuli mastocitari, precipitazione del colorante o materiale organico contaminante dell'orofaringe.

Flogosi delle vie aeree profonde (IAD, SAID)

(Couetil et al., 2007; Cardwell et al., 2011)

E' la malattia tipica del giovane galappatore o trottatore, infatti la sua prevalenza in alcune indagini raggiunge il 50% della popolazione esaminata e forse esiste familiarità. I cavalli non manifestano segni di malattia a riposo, ma manifestano "poor performace" o intolleranza all'esercizio, associate a tosse con o senza muco in eccesso in trachea e BAL con referto di flogosi non settica delle vie aeree profonde. La disfunzione polmonare è basata sull'evidenza di ostruzione delle vie aeree profonde, ipereattività delle vie respiratorie o alterazione del profile emogasanalitico a riposo o durante l'esercizio e da questa popolazione sono esclusi i cavalli con sintomi di malattie sistemiche e quelli con aumento del lavoro respiratorio a riposo.

Le cause predisponenti e forse perpetuanti sono in particolare le malattie virali respiratorie e l'influenza in testa, l'attività sportive, i trasporti e l'EIPH. La mucosa danneggiata diviene permeabile a materiale particolato, batteri commensali, esotossine, muffe e lieviti (*Micropolispora Faenia*, *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* etc), pollini, gas e irritanti vari pertanto la cattiva igiene ambientale aggrava la malattia. La riduzione della capacità della performance è causata dall'edema secondario alla flogosi, alla broncocostrizione operata dalla stimolazione del n. parasimpatico e l'alterata vischiosità del muco. La sintomatologia è vaga ed i criteri diagnostici sono moderato scolo nasale e tosse all'inizio della seduta di allenamento, diminuita performance, (a volte) difficoltà a seguire andature non proibitive sin dall'inizio dell'esercizio, difficoltà nel recupero, frequenza respiratoria elevata dopo lo sforzo, sudorazione eccessiva, presenza di muco bianco dopo esercizio su narici, nessun segno sistemico e di laboratorio ed infine nessuna o scarsa risposta a antibiotici. La conferma della diagnosi è possibile attraverso la valutazione emogasanalitici che mettono in evidenza l'ipercapnia e l'esame del BAL. Quest'ultimo permette di determinare l'elevato conteggio delle cellule che sono generalmente maggiori di 400/μl e alterazione della conta differenziale con aumento percentuale in particolare di neutrofili (>5%), eosinofili (>0,5%) e mastociti (>2%). Queste popolazioni di cellule infiammatorie possono essere aumentate singolarmente o in varie combinazioni e sono identificabili come: Flogosi Mista, Flogosi eosinofila, Flogosi Mastocitaria e Flogosi Neutrofila. Non è stato accertato se queste forme sia l'una l'evoluzione dell'altra e sono indistinguibili dal punto di vista clinico. Indipendentemente dalle forme il trattamento medico non cambia sostanzialmente. Non esiste un'uniforme consenso sulla Flogosi eosinofila che per alcuni autori è secondaria solo a verminosi polmonari (*Dictyocaulus arnfieldi*), mentre per altri può essere l'espressione iniziale di reazione di ipersensibilità di Tipo I all'inalazione di allergeni.

Pneumopatia cronica ostruttiva (COPD/RAO)

(Ainsworth e Hackett, 2004)

Malattia respiratoria dei cavalli adulti con predisposizione familiare caratterizzata da periodi di ostruzione reversibile delle vie aeree, causati da broncospasmo, iper-

reattività delle vie aeree, accumulo di neutrofili e di muco. Esiste una forte associazione tra ambiente e sintomatologia con meccanismi immunologici ancora da chiarire caratterizzati da una 1) risposta infiammatoria specifica a *Micropolispora Faeni*, *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* in grado di evocare il reclutamento di neutrofili in cavalli sani e con RAO ma sintomi solo in questi ultimi e 2) una risposta infiammatoria NON specifica a antigeni ambientali: Endotossine batteriche, acido lipoteicoico, peptidoglicani, DNA batterico, proteasi, tossine, Muffe, lieviti, micotossine e Gas nocivi (NH₃, NH₄, H₂S, metano). Il processo infiammatorio è una combinazione dei processi di ipersensibilità di tipo I e III che nel tempo vedono coinvolti i Th1 e Th2 con la definitiva sovraespressione di IL-8 e IL-17 che sono alla base del peculiare reclutamento dei neutrofili che sono la caratteristica di specie della RAO equina. La flogosi cronica, presente anche nei periodi di remissione, provoca con il tempo l'accumulo cellule infiammatorie nella sottomucosa: linfociti, mast-cells, plasma cells, occasionali eosinofili, l'iperproduzione di muco e accumulo in sede peribronchiale, l'alterazione della glicosilazione del muco che diviene più vischioso, l'iperplasia cellulare e la metaplasia multifocale delle Goblet cell. I sintomi possono variare molto in funzione della severità della flogosi e comprendono intolleranza all'esercizio, tosse, broncospasmo, dispnea, rinforzo espiratorio e scolo nasale.

Il quadro citologico tipico è l'aumento della componente di muco, del numero di neutrofili ed in minor misura dei macrofagi. In particolare nelle fasi iniziali della malattia è possibile osservare l'aumento degli eosinofili.

Inoltre a causa del carattere cronico di questa patologia che determina una persistente produzione di muco si possono osservare le spirali di Curschmann, infine le cellule epiteliali si possono presentare iperplastiche e agglomerate in cluster.

Emorragia polmonare da sforzo (EIPH)

(Ainsworth e Hackett, 2004)

Malattia respiratoria tipica della specie equina legata all'esercizio intenso e meno alla sua durata, che colpisce in particolare le porzioni profonde dei lobi caudo dorsali dei polmoni. Viene osservata in particolare nei galoppatori, trottatori e Quarter con una prevalenza maggiore nelle femmine. Fattori legati al progressivo aggravamento sono

la flogosi, l'avanzare dell'età e l'esercizio con il freddo. Ha una prevalenza elevatissima ed in particolare l'epistassi visibile viene osservata nello 0,2 (-13)% dei casi, mentre con l'endoscopia dopo sforzo è osservabile nel 75% ed addirittura nel BAL gli emosiderofagi sono presenti nel 100% dei casi. Non è ancora chiara la relazione tra gravità, numero delle emorragie e *poor performance*, ma sembra evidente che esistano due popolazioni: a) Soggetti con emorragia e *performance*/BAL normale (emosiderofagi comunque presenti) e b) Soggetti con emorragia, *poor performance* e BAL con molti emosiderofagi e lieve/moderata flogosi. Virtualmente ogni equino sotto sforzo massimale può soffrire di emorragia, ma nei cavalli predisposti episodi di emorragie ripetute esitano in danni parenchimatosi secondari alla flogosi indotta dagli emosiderofagi e dalla fibrosi. Con il tempo la compliance polmonare diminuisce per aumento della cellularità, proliferazione della neovascolarizzazione bronchiale e fibrosi interstiziale con il risultato di favorire e perpetuare gli episodi di emorragia dopo esercizio.

I cavalli con emorragia polmonare da sforzo possono presentare epistassi, ma nella maggior parte dei casi l'emorragia è localizzata esclusivamente a livello delle basse vie aeree. L'uso della tecnica BAL permette di diagnosticare l'EIPH e di determinare se il soggetto in esame ha già sofferto di EIPH nel passato.

In questa particolare malattia è indispensabile eseguire il BAL mediante tecnica endoscopica, poiché in particolare dopo l'esercizio è necessario osservare l'eventuale presenza di sangue lungo le vie aeree e assicurarsi di evitare di traumatizzare la mucosa bronchiale durante le fasi di infusione della soluzione fisiologica e recupero del lavaggio.

Sulla base dell'esame citologico è possibile stabilire se un soggetto ha già presentato episodi di emorragia polmonare: i macrofagi alveolari presentano eritrofagocitosi, o contengono i prodotti di degradazione dei GR come emosiderina ed ematoidina. L'emosiderina permane nei macrofagi per almeno 3 settimane in seguito ad un episodio di EIPH. Per questo motivo la colorazione del contenuto degli emosiderofagi è interessante per identificare episodi ripetuti di emorragia, in quelli recenti è possibile osservare direttamente gli eritrociti, in quelli intermedi il contenuto diventa giallo, in seguito verde malachite, nei più datati brunastro ed infine nero.

Infezioni da virus

E' stato descritto che le cellule epiteliali possono mostrare modificazioni morfologiche, quali marginazione della cromatina, inclusioni citoplasmatiche e/o multinucleazione e la citocilioftoria che indicano una infezione virale. Tuttavia questi segni sono aspecifici e difficili da riconoscere (Freeman et al., 1993).

Frequentemente ad una infezione virale segue una infezione batterica secondaria, ma da un punto di vista citologico non è possibile identificare differenze significative tra una polmonite batterica primaria da una secondaria, che consiste in un aumento dei neutrofili (Gross et al., 1998).

Infezione da funghi

(Rush e Mair, 2004)

Le infezioni da funghi sono conseguenti ad immunosoppressione o a gravi patologie a carico dell'apparato respiratorio o di altri organi, come enterocoliti, peritoniti, endotossiemia e setticemia. La reazione infiammatoria è di tipo purulento con la componente neutrofilia predominante, anche se è possibile riscontrare un aumento significativo dei macrofagi.

Non è frequente rilevare ife o spore fungine direttamente nel campione di BALF o dopo la semina sui terreni di coltura, comunque i funghi patogeni maggiormente riscontrati nelle basse vie aeree del cavallo è l'*Aspergillus* spp. Meno frequentemente si osservano *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*.

Infezioni da protozoi

(Ainsworth et al., 1993; Edwing et al., 1994)

Polmoniti possono essere causate da *Pneumocystis carinii* in soggetti immunodepressi o possono essere secondarie a polmoniti batteriche. Sulla base della citologia del BALF è possibile osservare una reazione infiammatoria di tipo misto

con aumento sia dei neutrofili che dei macrofagi. Anche la fase cistica del protozoo può essere direttamente osservata all'esame citologico.

PARTE SPERIMENTALE

La presente sperimentazione è stata condotta dall'Anno Accademico 2008/2009 all'Anno Accademico 2011/2012, presso le strutture del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa a San Piero a Grado (PI).

La sperimentazione è articolata nelle seguenti prove sperimentali:

1. Standardizzazione della metodica BAL;
2. Studio di variabili in grado di influenzare la valutazione del BALF:
 - a. Valutazione della ripetibilità nella lettura dei WBC e della quantità di muco nel BALF;
 - b. Confronto tra aliquote sequenziali e pool;
 - c. Valutazione citologica e batteriologica del BALF prima e dopo stimolazione ambientale.

I protocolli di ciascuna delle prove della sperimentazione sono stati approvati da C.E.A.S.A., Università di Pisa e finanziata con fondi Miur ex 60%.

PROVA SPERIMENTALE 1

STANDARDIZZAZIONE della METODICA di ESECUZIONE del BAL

Introduzione

(Hodgson, Hodgson, 2007)

Lo scopo di questa prima prova è stato quello di determinare una metodica standardizzata per l'esecuzione del BAL mediante tecnica endoscopica. Le indicazioni per l'esecuzione del BAL sono la tosse, lo scarso rendimento atletico, la presenza di muco in trachea e l'epistassi post-esercizio. Il BAL permette la raccolta di secrezioni provenienti dalle vie aeree più distali ed è consigliato nella diagnosi di processi infiammatori diffusi e/o cronici che caratterizzano la IAD, RAO e EIPH.

Materiali e metodi

E' stato eseguito un lavaggio bronco-alveolare (BAL) con il recupero del liquido refluo (BALF) su 40 cavalli.

- femmine fattrici di razza trotter;
- età compresa tra 3-6 anni;
- peso 435-563 kg;
- tutte sottoposte allo stesso tipo di gestione.

Gestione delle cavalle

Le fattrici erano poste in stabulazione libera all'interno di paddock 30 x 40 m, e per ogni paddock era previsto un numero massimo di 10 soggetti. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e di concentrati solo al pasto serale. Tutti i soggetti erano sottoposti a profilassi vaccinale per influenza, tetano e herpesvirus e trattati per parassitosi gastro-intestinali (ivermectina, 0,2mg/kg PO) secondo le linee guida dell'American Association of Equine Practitioners Infectious

Disease Committee (Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010).

La sera prima dell'esecuzione del BAL, le cavalle venivano spostate in box, 4 x 4 m, su lettiera in paglia e veniva somministrato un pasto leggero a base di fieno bagnato (4 kg di fieno pesato a secco). La mattina seguente la cavalle venivano lasciate a digiuno al fine di minimizzare i rischi legati all'effetto dei sedativi sulla motilità intestinale. Dopo l'esecuzione del BAL, le cavalle facevano ritorno ai box dove erano tenute sotto osservazione e a digiuno fino alla sera, e quindi re-imbrancate nei rispettivi paddocks.

Contenimento

Il BAL veniva eseguito in una sala del Dipartimento attrezzata con un travaglio, all'interno del quale veniva contenuto il cavallo.

In seguito, poco prima di iniziare l'endoscopia veniva applicato il torcinaso. L'uso del torcinaso garantisce l'immobilità del soggetto per mezzo di un riflesso nervoso. Questo effetto è particolarmente importante durante determinate fasi dell'esecuzione del BAL, come ad esempio durante l'introduzione dell'endoscopio lungo la narice. Infatti la mucosa della cavità nasale è estremamente sensibile e la presenza dell'endoscopio molto fastidiosa, e questo può portare l'animale a sottrarsi e a reagire con forza.

Sedazione ed anestesia locale

Una volta introdotte nel travaglio, le cavalle venivano sedate con l'uso di $\alpha 2$ -agonisti: Xilazina (0,4 mg/kg EV) o Detomidina (10 mcg/kg EV). La somministrazione è stata eseguita per via intravenosa in unico bolo, senza ripetere altri boli fino al completamento del BAL.

Durante l'esecuzione della metodica è stato somministrato un anestetico locale al fine di inibire il riflesso tussigeno. E' stata utilizzata Lidocaina 2% diluita all'1% con soluzione fisiologica 0.9% sterile a 37°C. L'anestetico, precaricato in siringhe da 20cc, veniva somministrato al bisogno attraverso un catetere posto nel canale di servizio dell'endoscopio. La quantità massima di anestetico infuso è stata di 100 ml. Le regioni dell'albero respiratorio dove è stato necessario somministrare maggiori quantità di anestetico sono la trachea, la biforcazione tracheale e l'albero bronchiale

fino ai bronchi di III-IV grado, laddove il riflesso della tosse è più intenso a causa della ricca innervazione di questi territori.

L'importanza di inibire il riflesso della tosse, mediante l'uso di un anestetico locale, risiede nel fatto che in questo modo è possibile ridurre il disagio dell'animale durante il passaggio dell'endoscopio lungo le vie aeree, evitare un contatto traumatico tra l'endoscopio e la mucosa della vie aeree durante l'accesso di tosse ed infine evitare che l'endoscopio venga sbalzato dalla sua sede durante la manovra di recupero del liquido refluo del lavaggio bronco-alveolare (BALF).

Sito di prelievo e materiale per il campionamento

Il campionamento del BALF è stato eseguito a livello dei bronchi di III-IV grado, transitando sempre dal lobo accessorio. L'ingresso dei bronchi di III-IV grado il diametro del bronco corrisponde al diametro dell'endoscopio utilizzato ed è quindi possibile occluderli completamente. In questo modo la soluzione fisiologica inoculata rimane nell'ambito del tratto bronchiolo-alveolare a valle dell'endoscopio, senza avere nell'immediato la possibilità di risalire prossimalmente e essere persa nei bronchi adiacenti, assieme al liquido bronco-alveolare refluo da campionare.

Per eseguire il lavaggio sono stati utilizzati 300 ml di soluzione fisiologica 0.9% sterile alla temperatura di 37°C.

La temperatura della soluzione fisiologica veniva mantenuta a 37°C per evitare fenomeni di vasocostrizione a carico della mucosa bronchiolo-alveolare che esiterebbero nella riduzione della cellularità del campione di BALF.

Il materiale utilizzato per l'esecuzione di un BAL è il seguente:

- Endoscopio 180 cm (Olympus CF Type EL, Giappone)
- Monitor
- Fonte di luce
- Catetere sterile 220 cm x 2,3 mm
- Siringhe da 20 cc n.ro 6
- Siringhe da 60 cc n.ro 5
- Sedazione con α_2 -agonisti
- Contenzione con torcinaso
- Anestetico locale
- Soluzione fisiologica sterile 0,9% (37°C)

- Provetta EDTA per esame citologico
- Provetta sterile per esame batteriologico

BAL mediante tecnica endoscopica standardizzata

Il cavallo veniva contenuto in un travaglio e sedato con α_2 -agonisti, quindi veniva pulita la narice dalla quale sarebbe stato introdotto l'endoscopio. La pulizia veniva eseguita con garze imbevute di acqua per rimuovere eventuale materiale organico presente intorno alla narice e successivamente una disinfezione con garze e betadine per abbattere la carica batterica all'interno della narice.

Mentre la strumentazione (endoscopio, fonte di luce e monitor) ed il materiale per il campionamento venivano preparati prima dell'ingresso del cavallo in sala travaglio, il catetere sterile veniva inserito nel canale di servizio dell'endoscopio solo al momento di introdurre l'endoscopio nella narice, al fine di limitare il rischio di una sua contaminazione, che avrebbe alterato l'esame batteriologico.

Applicato il torcinaso si introduceva l'endoscopio nella narice disinfettata, avendo cura di entrare nel meato nasale ventrale e di proseguire lungo di esso fino all'adito faringo-laringeo. Lungo questo tratto la mucosa nasale è molto sensibile e delicata, suscettibile di sanguinamento a seguito di un urto da parte dell'endoscopio, tuttavia l'uso del torcinaso garantisce una buona immobilità del soggetto e facilita le manovre dell'operatore. Per facilitare l'ingresso dell'endoscopio in trachea, si procedeva a desensibilizzare la glottide, le corde vocali e le cartilagini aritenoidee iniettando la soluzione di lidocaina 1%, precaricata in siringhe da 20 cc, su queste strutture.

Dopo l'ingresso in trachea si procedeva gradualmente per evitare si suscitare accessi di tosse violenti e si iniettava lidocaina al bisogno quando il cavallo tossiva, aspettando qualche secondo prima di proseguire fino a raggiungere la biforcazione tracheale. Superata la biforcazione tracheale si entrava nel lobo accessorio proseguendo fino a raggiungere i bronchi di III-IV grado che corrispondono alla sezione dell'endoscopio, pari a 13 mm. Questo ha permesso il lavaggio di un numero ampio di alveoli come indicato da AA (Hewson e Viel, 2002). Anche lungo questo tratto veniva iniettata lidocaina al manifestarsi dell'accesso di tosse.

Arrivati in profondità nello spazio bronchiale, era importante individuare un bronco che avesse un diametro corrispondente a quello dell'endoscopio e quindi di circa 13 mm, così da poter occludere completamente il bronco stesso. La certezza di aver

chiuso il bronco si poteva avere osservando il formarsi di alcune piccole pieghe della mucosa intorno all'endoscopio quando si provava delicatamente a proseguire oltre.

A questo punto veniva estroflesso di pochi centimetri il catetere sterile dal canale di servizio dell'endoscopio ed era possibile iniziare l'infusione di 300 ml di soluzione fisiologica 0.9% sterile a 37°C, la lidocaina ancora presente nel canale di servizio avrebbe contribuito a inibire il riflesso della tosse al momento dell'impatto tra il getto di fisiologica e la mucosa bronchiale. La soluzione è stata iniettata il più velocemente possibile con 5 siringhe da 60 cc in successione.

Al termine della somministrazione di soluzione fisiologica, il catetere veniva svuotato dalla fisiologica stessa iniettando 20 cc di aria da una siringa di 60 cc e con la medesima si procedeva immediatamente al recupero del liquido refluo del lavaggio bronco-alveolare. Durante l'aspirazione veniva esercitata una moderata pressione negativa lieve per evitare di danneggiare la mucosa bronchiale qualora il catetere si fosse avvicinato troppo alle pareti del bronco.

E' stato fissato come criterio di standardizzazione della metodica quello di recuperare il 40% della soluzione fisiologica iniettata, ovvero nel nostro caso una quantità pari a 120 ml.

Sul liquido recuperato, veniva eseguito un primo esame macroscopico per valutare la presenza di schiuma sulla superficie che confermava la presenza del surfactante alveolare e, quindi, che quello raccolto era effettivamente un campionamento del liquido bronco-alveolare (BALF).

Infine i 120 ml di BALF, recuperati in due o più siringhe da 60 cc, venivano ricostituiti in un unico campione e raccolto in provette con EDTA per l'esame citologico e in provette sterili per l'eventuale esame batteriologico.

Esame citologico

Lo scopo di eseguire l'esame citologico ha avuto quale scopo quello di verificare che il liquido recuperato mediante tecnica standardizzata fosse effettivamente di origine bronco-alveolare e che contenesse le cellule normalmente presenti sulla mucosa alveolare nelle proporzioni indicate in letteratura.

Il campione di BALF è stato processato entro 5 minuti dalla sua raccolta. E' stata eseguita la conta cellulare totale (HecoVet, Seac, Firenze). Sono stati citocentrifugati (Cytofuge 2, StatSpin, USA) 400 µl di BALF a 350 rpm per 5 minuti. I preparati

citologici sono stati asciugati all'aria e colorati con Diff Quick® (Dade Spa, Milano). La conta differenziale è stata determinata almeno su 400 cellule per preparato.

Risultati

Il BAL mediante tecnica endoscopica è stato completato in tutti i soggetti senza complicazioni. Tutti i soggetti hanno tollerato bene la sedazione alle dosi utilizzate durante l'esecuzione del BAL, mantenendo la stazione quadrupedale e senza la necessità di ripetere ulteriori somministrazioni di sedativo. Una volta riportati in box e alimentati di sera, non hanno mai presentato ileo o altri problemi intestinali. Anche l'uso dell'anestetico locale non ha causato la comparsa di complicazioni; in alcune occasioni, immediatamente dopo la fine del BAL e per pochi minuti (1-2 minuti) successivi, è stato possibile osservare una moderata perdita di liquido schiumoso da una o entrambe le narici rappresentato dalla fuoriuscita della soluzione fisiologica.

L'irrigazione delle vie aeree profonde con 300 ml di soluzione fisiologica, in parte recuperata e di anestetico locale, non hanno mai determinato la comparsa di sintomi respiratori quali dispnea, tosse o scolo nasale purulento, sia nel breve che nel lungo periodo.

L'uso dell'endoscopio non è risultato traumatico né per le alte vie aeree né per le basse. Non sono stati registrati episodi di epistassi e all'esame citologico non è stata osservata la presenza di eritrociti di possibile origine iatrogena. L'utilizzo del sedativo e dell'anestetico locale alle dosi somministrate e del torcinaso ci hanno consentito una contenzione del cavallo ottimale e permesso di eseguire correttamente e in sicurezza, sia per l'animale che per l'operatore, tutte le manualità necessarie per eseguire il BAL.

La citologia ha rivelato che i preparati citologici ottenuti dal campione di BALF erano di buona qualità e presentavano una cellularità elevata. Inoltre la conta cellulare differenziale ha messo in evidenza che le proporzioni reciproche delle popolazione cellulari sono quelle proprie del tratto bronco-alveolare. La quantità di 300 ml di soluzione fisiologica è sembrata essere adeguata per effettuare il lavaggio del tratto bronco-alveolare, raggiungere quindi lo spazio alveolare in profondità e recuperare un volume di almeno 120 ml.

Conclusioni

La tecnica del BAL permette il recupero di campioni di liquido bronco-alveolare dai territori più profondi delle vie aeree ovvero lo spazio alveolare. Questa tecnica viene utilizzata per la diagnosi di patologie croniche o sistemiche delle vie aeree profonde, poiché i campioni ottenuti si considerano rappresentativi dell'intero parenchima polmonare (McGorum et al., 1993).

L'uso di una tecnica endoscopica offre due vantaggi importanti. Innanzitutto permette la visualizzazione sia delle alte vie aeree sia delle basse, e quindi di apprezzare alterazioni anatomiche, processi flogistici in corso o la presenza di materiale patologico. Infatti nel caso in cui venga osservata l'aumento della presenza di muco è essenziale eseguire un esame citologico del BALF per interpretarne il vero significato (Beech, 1991).

Nella letteratura specialistica sono stati indicati criteri per la quantificazione del muco presente nelle basse vie aeree (Dixon et al., 1995; Holcombe et al., 2001; Gerber et al., 2004), ma la diagnosi clinica è molto più accurata se all'osservazione della presenza di muco vengono uniti i risultati della citologia.

Un ulteriore vantaggio nell'utilizzo dell'endoscopio risiede nelle dimensioni dello strumento. L'endoscopio utilizzato nella sperimentazione è lungo 180 cm e ha una sezione di 13 mm, e ci ha permesso entrare in profondità nell'albero respiratorio fino a raggiungere i bronchi di III-IV grado. Lo spazio bronco-alveolare sottostante comprende ancora un vasto numero di alveoli ed il campione raccolto e quindi rappresentativo di un territorio polmonare relativamente ampio, comunque maggiore rispetto a strumenti con un diametro inferiore che può raggiungere aree più periferiche del polmone, ma permette il campionamento di un numero ridotto di alveoli (Hewson e Viel, 2002).

La quantità di soluzione fisiologica iniettata influenza la conta cellulare totale (WBC e quella differenziale (Sweeney et al., 1992). Dalla letteratura non emerge un protocollo condiviso in maniera unanime in merito alla quantità di fisiologica da utilizzare per un BAL: il range di volume utilizzato dagli autori è ampio e varia tra 250 ml e 500 ml (Robinson, 2001) ed è riportato quale volume minimo per eseguire il BAL in un cavallo quello di 50 ml (Sweeney, 1991).

Nella nostra sperimentazione abbiamo utilizzato 300 ml di soluzione fisiologica. Tutti i campioni di BALF presentavano una buona cellularità alla lettura con contaglobuli e anche vetrini allestiti con citocentrifugazione presentavano una elevata cellularità, di buona qualità e facilmente leggibili.

Infine, la quantità di 300 ml sembra essere ottimale per ottenere campioni di BALF: il volume è sufficientemente ampio per eseguire un lavaggio profondo, anche dello spazio alveolare senza determinare un'eccessiva diluizione della cellularità del campione.

PROVA SPERIMENTALE 2a

VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA' NELLA LETTURA DEI WBC E DELLA QUANTITA' DI MUCO NEL BALF

Introduzione

La conta cellulare totale (numero di cellule/ μ l) e le percentuali delle popolazioni cellulari presenti nel liquido refluo del lavaggio bronco-alveolare (BALF) sono valutazioni importanti nella diagnosi e terapia delle patologie delle basse vie respiratorie del cavallo. E' noto che il numero totale di cellule/ μ l è influenzato dalla tecnica adottata per la raccolta del BAL, come ad esempio la quantità di soluzione salina iniettata o la quantità di fluido refluo raccolto, dal contacellule usato per la lettura o dalla quantità di muco e/o materiale organico (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).

Lo scopo del presente studio sperimentale è stato quello di verificare l'affidabilità degli strumenti di laboratorio nel produrre valori ripetibili e quindi attendibili della conta cellulare totale con contacellule automatico e della torbidità del BALF, quale espressione della presenza di muco attraverso l'analisi allo spettrofotometro. Pertanto sono state eseguite la:

- 1) Valutazione della ripetibilità della lettura mediante un contaglobuli per la quantificazione delle cellule totali nel BALF;
- 2) Quantificazione del muco del BALF mediante lettura allo spettrofotometro correlandolo al "*mucus score*" tracheale (Gerber et al., 2004).

Materiali e metodi

La popolazione campione su cui è stata condotta la sperimentazione era composta da:

- 31 cavalli: femmine fattrici di razza trotter;

- età compresa tra 3-6 anni;
- peso 435-563 kg (BCS medio 4).;
- tutte sottoposte allo stesso tipo di gestione.

Gestione delle cavalle

Le fattrici erano poste in stabulazione libera all'interno di paddock 30 x 40 m, e per ogni paddock era previsto un numero massimo di 10 soggetti. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e di concentrati solo al pasto serale. Tutti i soggetti erano sottoposti a profilassi vaccinale per influenza, tetano e herpesvirus e trattati per parassitosi gastro-intestinali (ivermectina, 0,2mg/kg PO) secondo le linee guida dell'American Association of Equine Practitioners Infectious Disease Committee (Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010).

La sera prima dell'esecuzione del BAL, le cavalle venivano spostate in box, 4 x 4 m, su lettiera in paglia e veniva somministrato un pasto leggero a base di fieno bagnato (4 kg di fieno pesato a secco). La mattina seguente la cavalle venivano lasciate a digiuno al fine di minimizzare i rischi legati all'effetto dei sedativi sulla motilità intestinale. Dopo l'esecuzione del BAL, le cavalle facevano ritorno ai box dove erano tenute sotto osservazione e a digiuno fino alla sera, e quindi re-imbrancate nei rispettivi paddocks.

Criteri di inclusione

- 1) I soggetti erano a riposo dall'attività agonistica non per cause legate a patologie dell'apparato respiratorio;
- 2) Vivevano in condizione di stabulazione libera (paddock) da un periodo superiore a 5 mesi;
- 3) Non presentavano patologie delle vie aeree profonde, valutata sulla base di:
 - Esame Obiettivo Generale e Particolare dell'apparato respiratorio;
 - Esame ecografico delle pleure (sonda convex, 5 MHz, Falco, Esaote, FI);

- Conta cellulare totale e differenziale nella norma (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).

Sono stati eseguiti 31 BAL con tecnica endoscopica e recuperati 31 campioni di BALF. Il BAL è stato eseguito con un colonscopio di 180 cm di lunghezza con diametro terminale di 13 mm (Olympus CF Type EL, Giappone) secondo la tecnica standardizzata. I soggetti sono stati posti in un travaglio, sedati con xilazina (0,4 mg/kg EV) e immobilizzati con torcinaso. Durante la discesa lungo la trachea e prima dell'esecuzione del BAL, la quantità di muco tracheale è stata quantificata con un punteggio da 0 a 5 (Gerber et al., 2004) (fig 1-2).

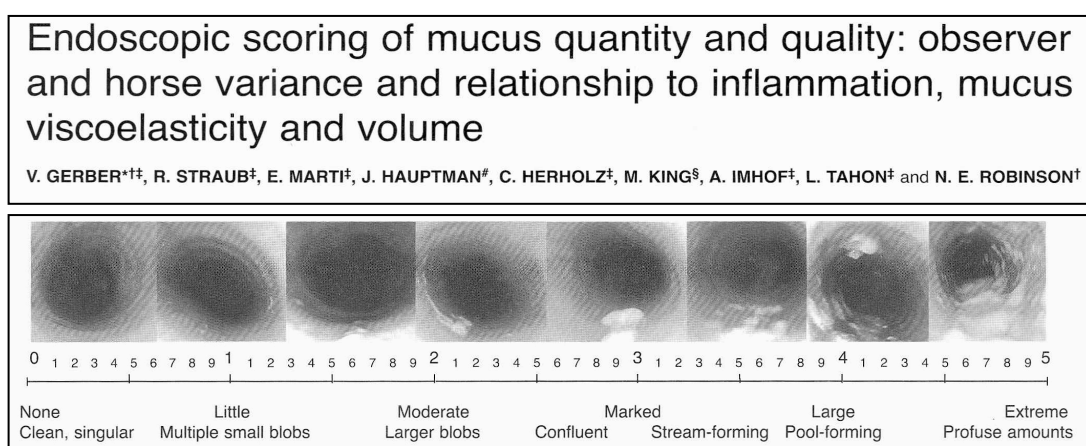


Figura 1. Score endoscopico per la valutazione quantitativa del muco tracheale (Gerber et al., 2004).

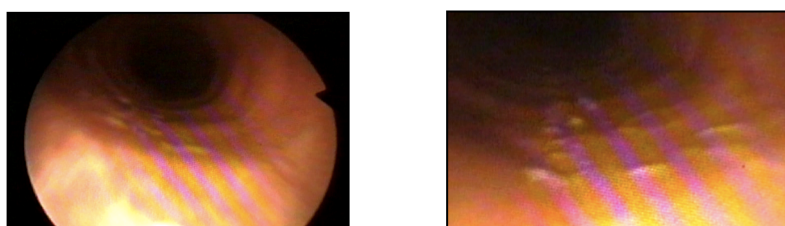


Figura 2. Visualizzazione endoscopica di muco in trachea. SCORE 3.

Al fine di ridurre il riflesso tussigeno è stato iniettato un anestetico locale (lidocaina 1%). Giunti a livello del sito di campionamento, sono stati quindi inoculati 300 ml di soluzione fisiologica sterile a 37°C con un catetere sterile introdotto nel canale di servizio dell'endoscopio. Il BALF è stato aspirato mediante suzione con siringhe da 60 ml in 3 aliquote da 40 ml ciascuna raggiungendo così un volume totale di almeno 120 ml, pari a circa il 40% della soluzione fisiologica iniettata. E' stato possibile

recuperare 120 ml in tutti i lavaggi eseguiti e questo è stato un parametro di inclusione importante dell'indagine per ottenere una adeguata cellularità e eseguire la conta cellulare differenziale in condizioni ottimali (Hodgson e Hodgson, 2007, Sgorbini et al, 2010).

Dopo omogeneizzazione delle tre aliquote sono stati prelevati 3 ml da ciascuna e raccolti in una provetta in EDTA per un totale di 9 ml, denominato campione finale. I campioni finali sono stati utilizzati per la misurazione della conta cellulare totale dei WBC ed infine da essi sono stati allestiti dei preparati citologici mediante citocentrifugazione (400 μ l centrifugati a 350 rpm per 5 minuti) (Cytofuge 2, StatSpin, USA) per eseguire la conta cellulare differenziale. I preparati citologici sono stati asciugati all'aria e colorati con metodo Diff-Quick (Dade spa, MI). La conta differenziale è stata determinata su almeno 400 cellule per preparato mediante lettura al microscopio 100X.

Al fine di verificare il primo scopo del lavoro, sui 31 campioni finali è stata eseguita la conta cellulare totale (WBC totali) per 3 volte consecutivamente mediante lettura al contaglobuli (HecoVet, Seac, Firenze).

Per verificare il secondo scopo del lavoro, i 31 campioni finali sono stati sottoposti per 3 volte consecutive a lettura mediante spettrofotometro (Slim, SEAC, FI) a lunghezza d'onda di 640 nm ed i risultati sono stati espressi in densità ottica (DO).

Analisi statistica

1. Ripetibilità lettura WBC al contaglobuli

Sui dati ottenuti dalla lettura mediante contaglobuli della conta cellulare totale (WBC) è stata verificata la distribuzione dei dati mediante il test Komolgorov Smirnov. Poichè la distribuzione dei dati è risultata normale, la valutazione tra le 3 letture dei WBC totali è stata effettuata mediante analisi della varianza a una via (ANOVA) seguito dal Bonferroni test come *post hoc*. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$.

2.a Quantificazione muco mediante spettrofotometro

Anche per i risultati ottenuti mediante lettura allo spettrofotometro è stata verificata la distribuzione dei dati delle DO mediante il test Komolgorov

Smirnov. Poichè la distribuzione è risultata normale, la valutazione tra le 3 letture delle DO è stata effettuata mediante analisi della varianza a una via (ANOVA) seguito dal Bonferroni test come *post hoc* al fine di verificare la ripetibilità delle letture allo spettrofotometro. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$.

2.b Correlazione mucus score tracheale e muco BALF

Quindi è stata calcolata la media delle 3 letture delle DO per ogni campione ed è stata calcolata la correlazione tra le medie e il *mucus score*. Anche in questo caso i risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$

Risultati

I risultati della conta totale cellulare (WBC) relativi alle 3 letture dei 31 campioni finali sono riportati in tabella 2. L'analisi della varianza non ha messo in luce differenze statisticamente significative tra le 3 letture eseguite (WBC_1 vs WBC_2 vs WBC_3) su ogni campione finale.

I risultati delle 3 letture mediante spettrofotometro, espresse in DO, eseguite in modo consecutivo su ciascuno dei 31 campioni finali, sono riportate in tabella 3. L'analisi della varianza non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le 3 letture (DO_1 vs DO_2 vs DO_3).

La media delle 3 letture delle DO (X-DO) per ogni campione finale è riportata in tabella 4, così come il *mucus score* (Gerber et al., 2004). È stata evidenziata una correlazione positiva statisticamente significativa tra le medie delle DO e il *mucus score* ($r: 0,82$) (fig. 3).

<i>N.</i>	WBC 1	WBC 2	WBC 3	<i>N.</i>	WBC 1	WBC 2	WBC 3
<i>1</i>	0,9	0,8	0,8	<i>17</i>	0,2	0,1	0,1
<i>2</i>	0,9	0,8	0,8	<i>18</i>	0,1	0,1	0,1
<i>3</i>	0,8	0,7	0,7	<i>19</i>	0,1	0,1	0,1
<i>4</i>	0,7	0,8	0,8	<i>20</i>	0,1	0,1	0,1
<i>5</i>	0,5	0,5	0,5	<i>21</i>	0,5	0,1	0,1
<i>6</i>	0,5	0,6	0,5	<i>22</i>	0,1	0,1	0,1
<i>7</i>	0,8	0,8	0,8	<i>23</i>	0,1	0,1	0,1
<i>8</i>	0,3	0,3	0,2	<i>24</i>	0,3	0,3	0,3
<i>9</i>	0,1	0,1	0,1	<i>25</i>	0,5	0,5	0,5
<i>10</i>	0,1	0,1	0,1	<i>26</i>	0,3	0,3	0,3
<i>11</i>	0,1	0,2	0,1	<i>27</i>	0,4	0,4	0,4
<i>12</i>	0,1	0,1	0,2	<i>28</i>	0,8	0,7	0,7
<i>13</i>	0,1	0,1	0,2	<i>29</i>	0,6	0,7	0,6
<i>14</i>	0,1	0,1	0,1	<i>30</i>	0,4	0,4	0,4
<i>15</i>	0,2	0,1	0,1	<i>31</i>	0,4	0,6	0,5
<i>16</i>	0,1	0,1	0,1				

Tabella 2 – Risultati della conta totale cellulare (WBC) relativi alle 3 letture consecutive dei campioni di BAL. Legenda: WBC 1: lettura 1; WBC 2: lettura 2; WBC 3: lettura 3.

N.	DO 1	DO 2	DO 3	N.	DO 1	DO 2	DO 3
1	0,17	0,17	0,17	17	0,04	0,05	0,05
2	0,17	0,17	0,17	18	0,05	0,05	0,04
3	0,14	0,14	0,14	19	0,04	0,04	0,04
4	0,16	0,16	0,16	20	0,03	0,03	0,04
5	0,17	0,17	0,17	21	0,03	0,04	0,04
6	0,10	0,10	0,11	22	0,03	0,03	0,02
7	0,20	0,26	0,23	23	0,03	0,03	0,03
8	0,05	0,05	0,05	24	0,07	0,07	0,06
9	0,03	0,03	0,03	25	0,09	0,09	0,06
10	0,03	0,03	0,03	26	0,07	0,12	0,06
11	0,03	0,03	0,03	27	0,24	0,22	0,21
12	0,03	0,03	0,03	28	0,41	0,25	0,24
13	0,05	0,04	0,05	29	0,76	0,76	0,76
14	0,03	0,04	0,032	30	0,25	0,22	0,22
15	0,03	0,03	0,03	31	0,19	0,23	0,23
16	0,04	0,05	0,05				

Tabella 3 - Risultati della lettura del muco tracheale espresso in densità ottica (DO) relativi alle 3 letture consecutive dei campioni di BAL. Legenda: DO 1: lettura 1; DO 2: lettura 2; DO 3: lettura 3.

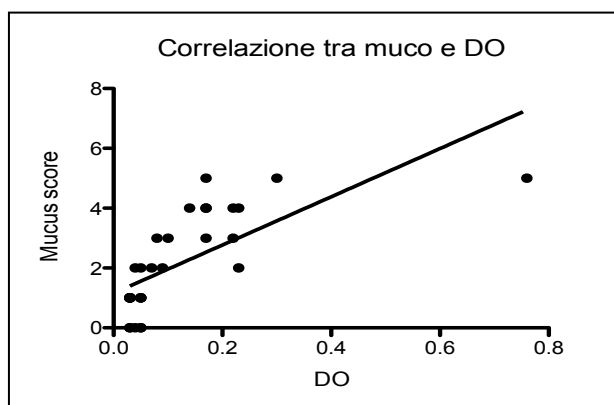


Figura 3. Correlazione tra le medie delle DO e il *mucus*. $r=0,82$.

Discussioni e conclusioni

La quantificazione del numero totale di cellule/ μ l, ed in particolare la conta totale dei WBC nel BALF, è di aiuto sia nella valutazione complessiva del preparato citologico, che nell'interpretazione della conta differenziale delle diverse popolazioni della linea bianca raccolte dalle vie respiratorie profonde. E' noto però che il numero totale di cellule/ μ l nel campione è soggetto a variabilità legata a diversi fattori, quali il volume di soluzione fisiologica iniettata, il volume di liquido refluo raccolto, la tecnica di campionamento e l'errore legato allo strumento di lettura (Mair et al., 1987; Pickles et al., 2002b,c).

Di conseguenza anche i valori di riferimento riportati in bibliografia sono variabili (Hodgson e Hodgson, 2007). Per questo motivo la conta cellulare totale del BALF è ancora ritenuta da alcuni autori di scarsa utilità (Sweeney e Beech, 1991; Pickles et al., 2002c; Hodgson e Hodgson, 2007), mentre da altri è considerata necessaria quale *screening* per differenziare cavalli sani da quelli affetti da IAD o RAO (Rush e Mair, 2004; Sgorbini et al., 2010).

Nel presente studio abbiamo voluto valutare la ripetibilità della misurazione della conta cellulare totale del campione di BALF ottenuto con metodica standardizzata (Hodgson e Hodgson, 2007), al fine di evidenziare eventuali variazioni legate allo strumento di lettura. I risultati da noi ottenuti confermano un'ottima ripetibilità di tale misurazione per mezzo del contacellule. Questo risultato è di grande utilità clinica poiché mostra che la conta cellulare totale è un valore costante e utilizzabile come parametro di laboratorio. Inoltre in base ai risultati del nostro studio sembra più realistico individuare un *cut off* tra soggetti sani e patologici più alto rispetto a quello indicato nella letteratura tradizionale, e quindi superiore a 300 cell/ μ l come indicato anche dalla letteratura più recente (Pickles et al., 2002c).

In base alla nostra esperienza è tuttavia consigliabile eseguire almeno 2 o 3 letture di verifica sul singolo campione soprattutto in presenza di una quantità cospicua di muco.

I risultati della misurazione mediante spettrofotometro della torbidità del campione di BALF confermano che lo strumento offre un'ottima ripetibilità della stima della presenza di muco nel campione. I nostri risultati supportano l'utilità della misurazione della torbidità del BALF allo spettrofotometro per la quantificazione del muco a livello delle basse vie aeree, perché correla con il *mucus score* tracheale. In

questo modo è possibile ottenere un valore di laboratorio e quindi oggettivo della quantità di muco presente. Nella nostra indagine all'aumentare del muco tracheale incrementava la DO del BAL. Indirettamente i nostri risultati concordano con le osservazioni di AA (Koblinger et al., 2011) che hanno evidenziato una correlazione positiva tra la quantità di muco tracheale e bronchiale. Infine la valutazione della torbidità del liquido refluo potrebbe essere un valido aiuto nella valutazione qualitativa del BALF anche in relazione al fatto che è di rapida esecuzione, di bassissimo costo e consente di limitare gli errori di interpretazione della presenza di muco in trachea o nei bronchi causati da inesperienza dell'operatore o difficoltà contingenti quali per esempio l'esecuzione "in campo", indole del soggetto, ecc....

PROVA SPERIMENTALE 2b

BAL NEL CAVALLO: CONFRONTO TRA ALIQUOTE SEQUENZIALI E POOL

Introduzione

In medicina equina il BAL viene eseguito principalmente per ottenere un campione di liquido bronco-alveolare su cui eseguire la conta cellulare totale (numero di cellule/ μ l) e differenziale, espressa come percentuale delle popolazioni cellulari presenti nel lavaggio broncoalveolare (BALF) ed eventualmente all'esame batteriologico. Questi dati consentono al clinico di completare l'iter diagnostico ed emettere la diagnosi definitiva di una malattia delle basse vie respiratorie e predisporre una terapia. Le popolazioni cellulari sono le stesse dei soggetti sani (Sweeney et al., 1992; McGorum et al., 1993c,d), ma varia il numero e il loro rapporto percentuale.

E' noto però che il numero totale di cellule/ μ l è influenzato da alcuni fattori, quali:

1. tecnica di campionamento (Hodgson e Hodgson, 2007);
2. sito di campionamento (Mair et al., 1987; McGorum et al, 1993a);
3. quantità di soluzione salina iniettata (Lam et al., 1985; Hodgson e Hodgson, 2007);
4. quantità di fluido refluo raccolto (Sweeney et al., 1992; Pickles et al, 2002c).

Delle quattro variabili suddette tre possono essere eliminate ricorrendo alla tecnica di esecuzione del BAL che abbiamo standardizzato nella prima prova sperimentale che prevede sito di campionamento e uso di una quantità di soluzione fisiologica costanti: ovvero l'utilizzo di un endoscopio di lunghezza non inferiore a 180 cm, la campionatura nello stesso distretto polmonare, l'infusione di 300 ml di soluzione salina e la raccolta di almeno 120 ml pari al 40% del liquido infuso.

La diversa diluizione del campione influenza non solo la conta totale delle cellule/ul, ma anche la percentuale delle singole popolazioni cellulari presenti nel BALF. E' stato dimostrato, che se raccolte aliquote ridotte (50 ml) la percentuale dei neutrofili e dei mastociti risulta rispettivamente superiore e inferiore a quelle di un campione più voluminoso (300 ml) (Sweeney et al., 1992).

Lo scopo di questa prova è valutare in che modo la quantità di fluido raccolto può influenzare la citologia del campione di BALF.

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse metodologie di campionamento per valutare l'effetto della diluizione del campione raccolto, come ad esempio la concentrazione dell'urea (McGorum et al, 1993b). Inoltre sia in medicina umana che in veterinaria sono stati pubblicati articoli sulla valutazione citologica del BAL eseguito con volumi diversi di soluzione salina instillata (Sweeney et al., 1992) o il confronto citologico tra aliquote sequenziali vs un bolo singolo (Sweeney et al., 1992; Mair et al., 1987), mentre esiste un unico articolo sull'analisi citologica di aliquote sequenziali nel cavallo (Pickles et al., 2002c).

Nel presente studio abbiamo raccolto il liquido del lavaggio bronco-alveolare in tre aliquote sequenziali, abbiamo costituito un loro *pool* e abbiamo verificato le eventuali differenze all'esame citologico.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato eseguito su una popolazione campione costituita da:

- 10 cavalli: femmine fattrici di razza trotter;
- età compresa tra 3-6 anni;
- peso 435-563 kg (BCS medio 4);
- tutte sottoposte allo stesso tipo di gestione.

Gestione delle cavalle

Le fattrici erano poste in stabulazione libera all'interno di paddock 30 x 40 m, e per ogni paddock era previsto un numero massimo di 10 soggetti. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e di concentrati solo al pasto serale. E'

stata effettuata la profilassi vaccinale per influenza, tetano ed herpesvirus secondo le linee guida dell'American Association of Equine Practitioners Infectious Disease Committee; e quella antiparassitaria con trattamenti antelmintici mediante ivermectina: 0,2mg/kg PO. La sera prima dell'esecuzione del BAL, le cavalle venivano spostate in box, 4 x 4 m, su lettiera in paglia e veniva somministrato un pasto leggero a base di fieno bagnato (4 kg di fieno pesato a secco). La mattina seguente le cavalle venivano lasciate a digiuno al fine di minimizzare i rischi legati all'effetto dei sedativi sulla motilità intestinale. Dopo l'esecuzione del BAL, le cavalle facevano ritorno ai box dove erano tenute sotto osservazione e a digiuno fino alla sera, e quindi re-imbrancate nei rispettivi paddocks.

Criteri di inclusione

- 4) I soggetti erano a riposo dall'attività agonistica non per cause legate a patologie dell'apparato respiratorio;
- 5) Vivevano in condizione di stabulazione libera (paddock) da un periodo superiore a 5 mesi;
- 6) Non presentavano patologie delle vie aeree profonde, valutata sulla base di:
 - Esame Obiettivo Generale e Particolare dell'apparato respiratorio;
 - Esame ecografico delle pleure (sonda convex, 5 MHz, Falco, Esaote, FI);
 - Conta cellulare totale e differenziale nella norma (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).
- 4) Raccolta di almeno 120 ml di BALF.

Sono stati eseguiti 10 BAL con tecnica endoscopica standardizzata e per ciascuno sono stati recuperati 120 ml di BALF.

Il BAL è stato eseguito con colonscopio (Olympus CF Type EL, Giappone) fatto passare attraverso il bronco del lobo accessorio destro fino a raggiungere ed occludere un bronco di III-IV grado. Durante la procedura i soggetti sono stati mantenuti in stazione quadrupedale previa sedazione con xilazina (0,4 mg/kg IV) associata all'applicazione di un torcinaso. Al fine di ridurre il riflesso tussigeno durante la procedura diagnostica, è stata instillato un anestetico locale (lidocaina 1%). Giunti a livello del sito di campionamento, sono stati iniettati 300 ml di soluzione

fisiologica sterile alla temperatura di 37°C mediante un catetere sterile introdotto nel canale di servizio dell'endoscopio, quindi il BALF è stato aspirato mediante suzione con siringhe da 60 ml.

Il fluido refluo è stato raccolto in 3 aliquote sequenziali (Aliquota 1, Aliquota 2, Aliquota 3) di circa 40 ml ciascuna per un totale di 120 ml, pari a circa il 40% della fisiologica totale iniettata. Dopo la raccolta di ciascuna aliquota e prima di raccogliere la successiva, il catetere è stato svuotato dal liquido raccolto in precedenza iniettando aria. Successivamente, dopo omogeneizzazione, è stato raccolto un campione di 30 ml da ciascuna delle tre aliquote per costituire il *pool*, denominato aliquota totale (tot).

Sia le aliquote che il *pool* sono stati processati in duplicato entro 5 minuti dalla raccolta. Su ogni aliquota è stata eseguita la conta cellulare totale (HecoVet, Seac, Firenze). Da ogni aliquota sono stati prelevati 400 µl e citocentrifugati (Cytofuge 2, StatSpin, USA) a 350 rpm per 5 minuti per allestire i preparati citologici che sono stati asciugati all'aria e colorati con Diff Quick® (Dade Spa, Milano). La conta differenziale è stata determinata almeno su 400 cellule per preparato.

Analisi Statistica

Sono state calcolate media (\bar{X}) \pm deviazione standard (DS) ed errore standard (ER) del numero totale di cellule/µl, delle 4 aliquote (1, 2, 3 e totale) e delle percentuali di macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili. Inoltre è stata verificata la distribuzione dei dati mediante il test Komolgorov Smirnov. Poiché la distribuzione dei dati non è risultata normale, la valutazione tra le diverse aliquote è stata effettuata mediante il Friedman test seguito da Dunn's test come post hoc. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$. Nel caso in cui il test di Friedman indicasse differenze intergruppo statisticamente significative, è stato applicato il Wilcoxon test, al fine di verificare le differenze tra coppie di aliquote, considerando significativi valori per $p < 0,05$.

Risultati

Nella tabella 4 sono riportati la media (X) e la deviazione standard (DS) per quanto riguarda la conta cellulare totale (cellule/ml) e quella differenziale delle popolazioni dei macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili, espressa in percentuale, eseguite sulle 3 aliquote sequenziali e sulla aliquota totale.

E' stata riscontrata una differenza intergruppo statisticamente significativa sulla percentuale dei macrofagi, dei linfociti e dei neutrofili. Il Wilcoxon test ha permesso di rilevare differenze significative per quanto riguarda sia i macrofagi che i linfociti, tra l'aliquota 1 vs 3 e totale, e per quanto riguarda i neutrofili tra l'aliquota 3 vs totale. Non sono emerse differenze statisticamente significative per la conta cellulare totale per gli eosinofili.

	A1 X±DS	A2 X±DS	A3 X±DS	Pool X±DS	Statistica
Cell/μl	488,9±136,4	522,2±164,1	544,4±142,4	510,0±110,0	NS
Macrofagi %	50,9±5,7 ^a	52,1±8,1 ^a	57,8±7,1 ^b	58,8±7,1 ^b	P<0,05
Linfociti %	44,1±7,0 ^c	42,3±10,0 ^c	36,5±8,4 ^d	37,5±6,2 ^d	P<0,05
Neutrofili%	5,1±2,1 ^e	4,5±3,1 ^e	5,2±3,4 ^e	3,5±2,9 ^f	P<0,05
Eosinofili %	0,2±0,4	0,2±0,4	0,1±0,1	0,7±0,9	NS

Tabella 4 – Media (X) ± deviazione standard (DS) del numero totale di cellule/μl, e della percentuale di macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili per 3 aliquote sequenziali (A1-A2-A3) e dell'aliquota totale (Pool).

Legenda: macrofagi a≠b; linfociti c≠d; neutrofili e≠f. Le stesse lettere indicano medie dei valori che non sono statisticamente significative, mentre lettere differenti indicano medie dei valori diverse in modo statisticamente significativo (P<0,05).

Discussioni e Conclusioni

Il presente studio non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa della conta cellulare totale tra le 3 aliquote sequenziali e rispetto all'aliquota totale. Sulla base di questo risultato si può ipotizzare che le aliquote sequenziali siano, quindi, rappresentative del numero di cellule presenti sull'intero campione e

paragonabili all'aliquota totale. Alcuni autori hanno riscontrato un numero inferiore di cellule totali nelle aliquote raccolte per prime rispetto a quelle raccolte per ultime (Mair et al., 1987). Altri (Pickles et al., 2002c) al contrario, non hanno evidenziato nessuna differenza sul numero totale di cellule tra aliquote raccolte in maniera sequenziale rispetto a un *pool*. Sebbene la raccolta delle aliquote sia stata eseguita in maniera diversa da entrambi i lavori citati, i nostri risultati sembrano confermare quelli riportati dalla letteratura più recente.

Il valore della conta cellulare totale è sempre risultato superiore a 300 cell/ μ l, quindi sulla base di questo studio possono essere considerate fisiologiche conte pari o inferiori a 300 cell/ μ l. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da alcuni autori (Pickles et al., 2002c). Questi, tuttavia, hanno rilevato anche una variabilità elevata dei risultati delle conte cellulari delle singole aliquote, che invece non è emersa nella prova sperimentale precedente nella quale non è stata evidenziata una variabilità statisticamente significativa delle letture al contaglobuli.

Nel nostro studio è stato osservato un aumento statisticamente positivo della percentuale dei macrofagi nell'aliquota 3 e nell'aliquota totale rispetto all'aliquota 1. Anche altri autori riportano una differenza intergruppo dei macrofagi tra le aliquote raccolte con una tendenza all'aumento, sebbene non abbiano evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa specifica (Pickles et al., 2002c).

Nel nostro caso l'aumento significativo della percentuale dei macrofagi potrebbe essere giustificato dal fatto che le aliquote raccolte per prime sarebbero più rappresentative della popolazione cellulare soprattutto bronchiale, mentre quelle raccolte per ultime, essendo più ricche di macrofagi, sarebbero più rappresentative della popolazione bronchiolare e alveolare (Mair et al., 1987; Pickles et al., 2002c).

Per quanto riguarda la percentuale di linfociti, i nostri risultati indicano una diminuzione statisticamente significativa della percentuale dei linfociti nell'aliquota 3 e nell'aliquota totale rispetto all'aliquota 1. Anche in questo caso la differenza tra i valori percentuali dei linfociti tra prime aliquote rispetto alle ultime può essere giustificato dal fatto che le prime, essendo più ricche di linfociti, sono più rappresentative della popolazione bronchiale.

Sulla base di queste considerazioni il recupero di campioni di BALF di volume pari alle prime aliquote (40 ml) possono essere poco rappresentativi di un lavaggio propriamente bronco-alveolare, mentre volumi superiori, ovvero pari a 120 ml, risultano contenere le popolazioni cellulari tipicamente alveolari e perciò essere più

attendibili e rappresentativi di un BAL.

Per quanto riguarda la percentuale dei neutrofili nel presente studio è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra l'aliquota 3 rispetto all'aliquota totale, dove è stata osservata una diminuzione del numero dei neutrofili. Sulla base di questo risultato anche per i neutrofili è consigliabile recuperare un volume di BALF cospicuo (120 ml), al fine di ottenere un valore attendibile della loro percentuale.

I risultati ottenuti da questo studio in merito ai neutrofili sono dissimili rispetto a quanto riportato in letteratura (Pickles et al., 2002c) dove è stata osservata una similitudine delle percentuali dei neutrofili tra le aliquote sequenziali e quella totale. Secondo questi autori anche nel caso di recupero di piccole quantità di BALF (40 ml), la percentuale di neutrofili potrebbe essere rappresentativa della quantità di neutrofili presente a livello bronco-alveolare e quindi di utile valore diagnostico.

In conclusione, ad eccezione della conta cellulare totale e della percentuale degli eosinofili, le altre popolazioni cellulari (macrofagi, linfociti e neutrofili) variano con la quantità di liquido raccolto e sembra esistere una differenza importante tra le aliquote raccolte per prime rispetto all'ultima e a quella totale. Per questo la stima delle percentuali delle popolazioni cellulari e la valutazione critica dell'esecuzione del BAL sembrano essere più attendibili se il campione di BALF recuperato è di almeno 120 ml, che offre maggiori garanzie di essere più rappresentativo delle popolazioni cellulari dello spazio bronco-alveolare.

PROVA SPERIMENTALE 2c

VALUTAZIONE CITOLOGICA E BATTERIOLOGICA PRIMA E POST STIMOLAZIONE AMBIENTALE

Introduzione

Dalla letteratura sappiamo che cavalli con segni clinici di RAO presentano un quadro citologico del BALF caratterizzato da una conta cellulare totale elevata e da un aumento della proporzione della popolazione dei neutrofili, mentre soggetti con la medesima patologia in fase di remissione presentano un quadro citologico del BALF normale (Lavoie et al., 2004). Tuttavia questi soggetti, a differenza di quelli sani, presentano modificazioni della citologia del BALF già dopo un periodo minimo di 5 ore di stabulazione con esposizione agli allergeni contenuti nella paglia o nel fieno in condizioni di scarsa ventilazione. Infatti, questa esposizione (*challenge*) induce neutrofilia nel BALF, aumento della produzione di muco bronchiale e la manifestazione dei sintomi clinici della RAO (Hodgson e Hodgson, 2004). Secondo l'autore non esistono informazioni riguardo l'alterazione della citologia del BALF in soggetti sani dopo esposizione ambientale (*challenge*).

Lo scopo della presente prova ambientale è quello di verificare come varia la citologia e la batteriologia del BALF ottenuto da soggetti sani non in attività agonistica prima e dopo stimolazione ambientale.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato eseguito su una popolazione campione costituita da:

- 10 cavalli: femmine fattrici di razza trotter;
- età compresa tra 3-6 anni;
- peso 435-563 kg (BCS medio 4);

- tutte sottoposte allo stesso tipo di gestione.

Gestione delle cavalle

Le fattrici erano poste in stabulazione libera all'interno di paddock 30 x 40 m, e per ogni paddock era previsto un numero massimo di 10 soggetti. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e di concentrati solo al pasto serale. E' stata effettuata la profilassi vaccinale per influenza, tetano ed herpesvirus e quella antiparassitaria con trattamenti antielmintici mediante ivermectina: 0,2mg/kg PO.

La sera prima dell'esecuzione del BAL, le cavalle venivano spostate in box, 4 x 4 m, su lettiera in paglia e veniva somministrato un pasto leggero a base di fieno bagnato (4 kg di fieno pesato a secco). La mattina seguente la cavalle venivano lasciate a digiuno al fine di minimizzare i rischi legati all'effetto dei sedativi sulla motilità intestinale. Dopo l'esecuzione del BAL, le cavalle facevano ritorno ai box dove erano tenute sotto osservazione e a digiuno fino alla sera, e quindi re-imbrancate nei rispettivi paddocks.

Criteri di inclusione

- 1) I soggetti erano a riposo dall'attività agonistica non per cause legate a patologie dell'apparato respiratorio;
- 2) Vivevano in condizione di stabulazione libera (paddock) da un periodo superiore a 5 mesi;
- 3) Non presentavano patologie delle vie aeree profonde, valutata sulla base di:
 - Esame Obiettivo Generale e Particolare dell'apparato respiratorio;
 - Esame ecografico delle pleure (sonda convex, 5 MHz, Falco, Esaote, FI);
 - Conta cellulare totale e differenziale nella norma (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).
- 4) Raccolta di almeno 120 ml di BALF.

Stimolazione ambientale

Tutti i soggetti che hanno rispettato i criteri di inclusione dopo l'esecuzione del primo BAL con esito favorevole sono stati spostati dai rispettivi paddocks in un box e qui sono rimasti per 15 gg consecutivi. I cavalli erano stabulati su lettiera di paglia e alimentati con 3 pasti giornalieri di fieno ed 1 serale a base di concentrati.

La ventilazione del box era limitata alla finestra della porta del box che veniva lasciata aperta durante il giorno e chiusa di notte. Inoltre i cavalli rimanevano all'interno del box anche durante le manovre di pulizia della lettiera, momento in cui era massima l'esposizione agli allergeni ambientali, presenti in maniera particolare nella paglia e nel fieno.

Al termine dei 15 gg di stabulazione veniva eseguito un secondo BAL con tecnica standardizzata.

Esecuzione BAL

Il BAL è stato eseguito con colonscopio (Olympus CF Type EL, Giappone) fatto passare attraverso il bronco del lobo accessorio destro fino a raggiungere ed occludere un bronco di III-IV grado. Durante la procedura i soggetti sono stati mantenuti in stazione quadrupedale previa sedazione con xilazina (0,4 mg/kg IV) associata all'applicazione di un torcinaso. Al fine di ridurre il riflesso tussigeno durante la procedura diagnostica, è stata instillato un anestetico locale (lidocaina 1%). Giunti a livello del sito di campionamento, sono stati iniettati 300 ml di soluzione fisiologica sterile alla temperatura di 37°C mediante un catetere sterile introdotto nel canale di servizio dell'endoscopio, quindi il BALF è stato aspirato mediante suzione con siringhe da 60 ml.

Ciascun soggetto è stato sottoposto a due BAL con tecnica endoscopica standardizzata: il primo all'inizio dello studio ed il secondo dopo stimolazione ambientale. Quindi sono stati eseguiti in totale 20 BAL e per ciascuno sono stati recuperati 120 ml di BALF.

I campioni di BALF sono stati raccolti in provette con EDTA per la citologia e in provette sterili per l'esame batteriologico e processati entro 5 minuti dalla raccolta. I campioni nelle provette con EDTA sono stati usati per ottenere la conta cellulare totale mediante contaglobuli (HecoVet, Seac, Firenze). Sono stati allestiti i preparati

citologici mediante citocentrifugazione (Cytofuge 2, StatSpin, USA) a 350 rpm per 5 minuti, quindi sono stati asciugati all'aria e colorati con metodo Diff Quick® (Dade Spa, Milano). La conta cellulare differenziale è stata determinata contando 400 cellule per vetrino.

Dalle provette sterili sono stati presi i campioni per la batteriologia e sono stati usati terreni di coltura con Agar sangue con e senza supplemento selettivo per *Streptococcus* spp, Agar mannitolo e Agar MacConkey. E' stato fatto ricorso alla tecnica PCR per l'identificazione degli Streptococchi beta-emolitici: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e per *Rhodococcus equi*. Per questo scopo il DNA è stato estratto come in precedenza riportato AA (Laus et al., 2007).

Analisi Statistica

Sono state calcolate la media (X) e la deviazione standard (SD) sia per la conta cellulare totale (Cell/ μ l) che per le percentuali dei macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili ottenute sia prima che dopo stimolazione ambientale.

E' stato eseguito il test *Komolgorov-Smirnov* per verificare che la distribuzione dei dati fosse normale. Quindi è stato eseguito il test *t-student* per dati appaiati per verificare differenze statisticamente significative tra i valori pre e post-stimolazione. E' stata fissata la significatività per $p < 0,05$.

Risultati

Esame citologico

I risultati ottenuti dai BAL pre-stimolazione e post-stimolazione sono riportati nella tabella 5 sia per quanto riguarda la conta cellulare totale (cell/ μ l), che le popolazioni cellulari macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili, espresse in percentuali.

	<i>PRE-STIMOLAZIONE</i>	<i>POST-STIMOLAZIONE</i>	<i>STATISTICA</i>
Cell/μL	230\pm150^a	680\pm258,8^b	P<0,05
Macrofagi %	57,6 \pm19,6	57,1 \pm 19,4	NS
Linfociti %	27,6 \pm9,7	30,8 \pm 12,6	NS
Neutrofili %	3,3 \pm3,6^c	4,3 \pm 4,1^d	P<0,05
Eosinofili %	0,9 \pm 1,3^e	3,4 \pm 5,1^f	P<0,05

Tabella 5– Media (X) \pm deviazione standard (DS) del numero totale di cellule/ μ L, e della percentuale di macrofagi, linfociti, neutrofili ed eosinofili ottenuti pre e post stimolazione ambientale.

Legenda: cell/ μ L a \neq b; neutrofili c \neq d; eosinofili e \neq f. Le stesse lettere indicano medie dei valori che non sono statisticamente significative, mentre lettere differenti indicano medie dei valori diverse in modo statisticamente significativo (P<0,05).

Da questi risultati è emerso che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori ottenuti prima e dopo stimolazione per la conta cellulare totale, percentuali dei neutrofili e degli eosinofili.

Al contrario non è stata osservata una differenza statisticamente positiva per le percentuali dei macrofagi e dei linfociti prima e dopo stimolazione.

Esame batteriologico

I risultati dell'esame batteriologico eseguito sui BALF prima e dopo stimolazione sono riportati nella tabella 6. Le popolazioni batteriche più rappresentate sia prima che dopo stimolazione sono il *Bacillus* spp. e Coagulase Negative *Staphylococcus*. Lo *Streptococcus* spp. è stato isolato in un soggetto solo dopo stimolazione ambientale.

	PRE-STIMOLAZIONE	POST-STIMOLAZIONE
<i>Bacillus spp.</i>	9/10	8/10
Coagulase Negative <i>Staphylococcus</i>	7/10	7/10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2/10	3/10
<i>Pseudomonas spp.</i>	2/10	3/10
<i>Oerskovia spp.</i>	1/10	-
<i>E. coli</i>	1/10	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-	1/10

Tabella 6. Risultati relativi all'esame batteriologico pre- e post- stimolazione ambientale.

Tecnica PCR

Per mezzo della PCR è stato isolato *Streptococcus zooepidemicus* in 3 soggetti solo dopo stimolazione (tabella 7). Non sono state trovate positività a *Streptococcus equi* e *Rhodococcus equi*.

	PRE-STIMOLAZIONE	POST-STIMOLAZIONE
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	-	3/10
<i>S. equi subsp. equi</i>	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-

Tabella 7. Risultati relativi all'esame di diagnostica molecolare (PCR) sull'isolamento batterico pre- e post- stimolazione ambientale.

Il *mucus score* dei soggetti esaminati è risultato 1 prima della stimolazione e 2-3 dopo la stimolazione.

Conclusioni

Dai risultati ottenuti in questo studio è stato possibile osservare che dopo esposizione ad allergeni ambientali la conta cellulare totale (cell/ μ l), i neutrofili, gli eosinofili e la produzione di muco sono aumentati.

L'incremento del valore della conta cellulare totale dopo stimolazione ambientale non è concorde con quello riportato da alcuni AA (Tremblay et al., 1993; Holcombe et al., 2001), mentre altri hanno ottenuto risultati analoghi ai nostri (Lavoie et al., 2004). Questi ultimi hanno ipotizzato che i valori più elevati della conta cellulare totale siano la conseguenza di un fenomeno di reclutamento cellulare a livello delle vie aeree profonde nei confronti di allergeni ambientali.

Anche la popolazione dei neutrofili aumenta a seguito di stimolazione ambientale e questo è un dato concorde con la bibliografia, anche se vengono riportati incrementi inferiori rispetto a quelli osservati in questo studio (Tremblay et al., 1993; Holcombe et al., 2001). L'aumento della percentuale dei neutrofili, secondo questo studio e secondo anche gli AA, indica che l'esposizione ad allergeni ambientali evoca un meccanismo di difesa da parte dell'apparato respiratorio.

Di conserva all'aumento della percentuale dei neutrofili, nel nostro studio è risultata aumentata anche la percentuale degli eosinofili. Questo risultato è concorde con la bibliografia (Holcombe et al., 2001) e in particolare indica una risposta di tipo I di fronte agli allergeni ambientali (Hodgson e Hodgson, 2007).

Sulla base dei risultati della presente indagine è stato possibile constatare che il quadro citologico ottenuto dopo stimolazione ambientale in soggetti clinicamente sani e non in attività sportiva è simile a quello che si ottiene da cavalli con patologie respiratorie in corso (Hodgson e Hodgson, 2007). Questo risultato sembra una naturale reazione di difesa della specie equina nei confronti di polveri ed aeroallergeni ambientali caratterizzato da neutrofilia, eosinofilia ed aumento della produzione di muco. Come ovvio nei soggetti geneticamente predisposti a RAO con il passare del tempo il processo infiammatorio di ipersensibilità provoca la comparsa di sintomi respiratori mentre nei sani possono essere osservate solamente modificazioni del quadro citologico del BALF.

I batteri isolati sia prima che dopo la stimolazione appartengono alla normale microflora bronchiale (Slater, 2004). Sulla base dei risultati della PCR, *S. zooepidemicus* è

stato isolato in tre casi solo dopo stimolazione ambientale pur essendo un batterio commensale delle vie aeree superiori. E' possibile giustificare questo risultato in considerazione del fatto che i fenomeni che si instaurano a seguito dell'esposizione ambientale ed in particolare l'aumento della produzione di muco e la ridotta attività muco-ciliare sono fattori predisponenti la prolungata permanenza di batteri del tratto respiratorio profondo facilitandone così l'isolamento. L'isolamento dello *S. zooepidemicus* in un numero di casi maggiore mediante PCR conferma la maggiore sensibilità della tecnica bio-molecolare rispetto all'esame batteriologico. L'assenza di positività al *Rhodococcus equi* nei BALF esaminati è in accordo con l'età dei soggetti in esame perchè gli adulti sani sono portatori del batterio solo in sede intestinale.

Infine sulla base dei risultati di questo studio la stimolazione ambientale in equini sani non sembra favorire la colonizzazione da parte di batteri opportunisti e patogeni a conferma delle adeguate difese immunologiche e non dell'apparato respiratorio.

Conclusioni generali

L'esame endoscopico del tratto respiratorio offre indubbi vantaggi per l'ispezione delle vie aeree sino a che la lunghezza e calibro dell'endoscopio lo permettono, la quantificazione del muco e il prelievo del BALF (Beech, 1991; McGorum et al., 1993a; Hewson e Viel, 2002). La nostra indagine conferma quanto importante sia standardizzare la metodica di prelievo del BALF utilizzando un endoscopio di 180 cm di 13 mm di diametro e la quantità di 300 ml di soluzione salina in cavalli di 400-500 kg. I campioni di BALF prelevati nella quantità di 120 ml presentavano una cellularità adeguata per permettere agevolmente la lettura con contaglobuli automatico e per allestire preparati citologici di buona qualità. La citocentrifugazione ha consentito di standardizzare ulteriormente la valutazione del preparato citologico perché sono stati usati sempre gli stessi volumi di BALF e concentrati in una porzione circolare di 6 mm di diametro del vetrino portaoggetto.

I risultati a riguardo della conta cellulare totale permettono allo studio di suggerire che, sebbene non sia ancora chiara l'importanza di questo parametro ai fini della valutazione del quadro flogistico delle basse vie aeree, il *cut off* debba non essere inferiore a 300 cell/ μ l perché anche il reclutamento di cellule infiammatorie secondario alla sola stimolazione ambientale è sufficiente a superare in molti casi questo limite. Per questo motivo riteniamo che l'anamnesi ambientale debba tenere in giusto conto questo fattore per valutare criticamente i risultati dell'esame del BALF perché questa indagine dimostra che dopo esposizione ad allergeni/antigeni ambientali la conta cellulare totale, i neutrofili, gli eosinofili e la produzione di muco sono aumentati. La ripetibilità della lettura al contaglobuli conforta sui risultati forniti dallo strumento rendendo più attendibile il dato. In base alla nostra esperienza è tuttavia consigliabile eseguire almeno 2 o 3 letture di verifica sul singolo campione in particolare in presenza di una quantità cospicua di muco.

I risultati dell'esame citologico delle tre frazioni sequenziali confermano in gran parte quanto osservato da AA (Mair et al., 1987; Pickles et al, 2002c) e sottolineano l'importanza di collezionare quantità di circa 120 ml di BALF in modo da ottenere un campione che verosimilmente ha raggiunto anche le vie aeree alveolari e raccolto cellule infiammatorie rappresentative in quantità e giuste percentuali dello stato flogistico delle basse vie aeree. I risultati della misurazione mediante

spettrofotometro della torbidità del campione di BALF per la stima della presenza di muco correlano con il *mucus score* tracheale. Questo permette di rendere oggettivo un importante parametro clinico con rapidità e limitato impegno economico.

I batteri isolati sia prima che dopo la stimolazione appartengono alla micro-flora commensale bronchiale e lo *S. zooepidemicus*, che è il batterio più frequentemente isolato nelle infezioni delle vie respiratorie (Slater, 2004), è stato isolato solo con PCR e non con l'esame batteriologico, in appena tre casi nel prelievo dopo stimolazione ambientale. Sulla base di questi risultati sembra che in cavalli sani il reclutamento di cellule infiammatorie, la produzione di muco e verosimilmente la competente barriera mucosa siano sufficienti a non permettere la colonizzazione batterica delle basse vie aeree anche quando il confinamento in ambienti chiusi espone l'apparato respiratorio a un carico ambientale maggiore di allergeni e antigeni. In conclusione, il numero limitato di indagini per la valutazione dei problemi delle basse vie aeree del cavallo, impone ai clinici l'utilizzo di metodiche come quelle indagate nella presente tesi. Per questo motivo corre l'obbligo di seguire in maniera scrupolosa le indicazioni della letteratura scientifica specialistica per il campionamento del BALF in modo da valutare correttamente i dati di laboratorio.

A nostro avviso sarebbe importante che altre indagini studiassero quanto la presenza di muco alteri la conta cellulare totale e la valutazione percentuale delle cellule infiammatorie che inevitabilmente imprigiona.

BIBLIOGRAFIA

Ainsworth DM, Weldon AD, Beck KA, Rowland PH (1993). Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress. *Equine Vet J*, 25: 103-108.

Ainsworth DM, Hackett RP (2004). Fungal Pneumonia. In Rush B, Mair T (eds). *Equine respiratory diseases*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing Co, Oxford, UK, pp. 285-287.

Allen KJ, Tremaine WK, Franklin SH (2006). Prevalence of inflammatory airway disease in national hunt horses referred for investigation of poor athletic performance. *Equine Vet J Suppl*, 36: 529-34.

Bain FT (1997). Cytology of the respiratory tract. *Vet Clin North Am Eq Pract*, 13(3): 477-86.

Beech J (1975). Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Vet Pathol*, 12: 157- 164.

Beech J (1991) Chronic obstructive pulmonary disease, *Vet Clin North Am Equine Pract*, 7: 79-91.

Bursh e Jensen (1987). The use of cytology in the diagnosis of equine respiratory infections. *Equine Pract*, 9(2): 7-10.

Cardwell JM, Christley RM, Gerber V, Malikides N, Wood LJLN, Newton JR, Hodgson JL (2011). What's in a name? Inflammatory airway disease. *Equine Vet J*, 43(6): 756-758.

Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, Lavoie JP (2007). Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med*, 21: 356–361.

Crystal RG, Reynolds HY, Kalica AR (1986). Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. Chest, 90: 122-131.

Derksen FJ, Robinson NE, Scott JS, Stick JA (1989). Aerosolized Micropolyspora faeni antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). J Vet Res, 49: 933-938.

Di Fabio V, Ferrucci F, Zucca E, Croci C (2003). Emorragia polmonare da sforzo (EIPH): diagnosi e valutazione citologica degli emosiderociti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) in 77 cavalli trottatori. LVI Congresso nazionale SISVet, Ischia (NA), pp. 259-260.

Dixon PM, Railton DI, McGorum BC (1995). Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. Equine Vet J, 27: 428-435.

Dixon PM (1997). Ancillary diagnostic techniques for the investigation of equine pulmonary disease. Equine Vet Educ, 9: 72-80.

Ewing PJ, Cowell RL, Tyler RD, MacAllister CG, Meinkoth JH (1994). *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals. JAVMA, 204: 929-933.

Fleury-Feith J, Escudier E, Pocholle MJ, Carre C, Bernaudin JF (1987). The effects of cytocentrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. Acta Cytol, 31(5):606-10.

Freeman KF, Rosze JF, McClure JM, Mannsman R, Patton PE, Naile S (1993). A review of cytological specimens from horses with and without clinical signs of respiratory disease. Equine Vet J, 25: 523-526.

Fogarty U (1990). Evaluation of bronchoalveolar lavage technique. Equine Vet J, 22: 174-176.

Fogarty U, Buckley T (1991). Bronchoalveolar lavage finding in horses with exercise intolerance. *Equine vet J*, 23: 434-437.

Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, Imhof A, Tahon L, Robinson NE (2004). Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J*, 36(7): 576-82.

Gross DK, Hinchcliff KW, French PS, Goclan SA, Lahmers KK, Lauderdale M, Ellis JA, Haines DM, Slemons RD, Morley PS et al (1998). Effect of moderate exercise on the severity of clinical signs associated with influenza virus infection in horses. *Equine Vet J*, 30: 489-497.

Hare JE, Viel L, O'Borne PM, Conlon (1994). Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Therap*, 17: 237-244.

Hewson J, Viel L (2002). Sampling microbiology and cytology of the respiratory tract. In: lekeux P(Ed) . *Equine Respiratory Diseases*. IVIS, Ithaca, New York, USA.

Hodgson JL, Hodgson DR (2003). Tracheal Aspirates: indications, technique, and interpretation. In Robinson NE (ed). *Current therapy in Equine medicine*. 5th ed. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 401-406.

Hodgson JL e Hodgson DR (2007). Collection and analysis of respiratory tract samples. In McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J (eds). *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. 1st ed. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 119-150.

Hoffman AM, Viel L (1997). Techniques for sampling the respiratory tract of horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 13 (3): 463-475.

Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney, C Eberhart S, Robinson NE (2001). Stabling in associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J* 33(3): 244-249.

http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010

Jang SS, Biberstein EL, Hirsh DC (1987). *Actinobacillus suis*-like organisms in horses. *Am J Vet Res*, 48:1036-1038.

Lam S, Le Riche JC, Kijek (1985). Effect of filtration and concentration on the composition of bronchoalveolar lavage fluid. *Chest*, 87:740-742.

Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP (1994). Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J*, 26: 227-229.

Larson VL, Busch RH (1985). Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopatologic findings. *Am J Vet Res*, 46: 144-146.

Laus F, Preziuso S, Spaterna A, Beribè F, Tesei B, Cuteri V (2007). Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by Beta-haemolytic Streptococci in horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30: 247-260.

Laviolette M, Carreau M, Coulomb R (1988). Bronchoalveolar lavage cell differential on microscope glass cover: a simple and accurate technique. *Am Rev Respir Dis*, 138: 451-457.

Lavoie JP, Fiset L, Laverty S (1994). Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. *Equine Vet J*, 26(5):348-52.

Leclere M, Desnoyers M, Beuchamp G, Lavoie JP (2006). Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Int Med*, 20: 377-381.

Mair TS, Stokes CR, Bourne FJ (1987). Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Vet J*, 19: 458-462.

Mansmann RA, Knight HD (1972). Transtracheal aspiration in the horse. *JAVMA*, 160: 1527-1529.

Marlin DJ (2003). Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. In: Robinson NE (ed). *Current Therapy in equine Medicine*. 5th ed, Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 429-433.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P (1993a). Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of equine lung. *Res Vet Sci*, 55:57-59.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P (1993b). Evaluation of urea and albumen as endogenous markers of dilution of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Res Vet Sci*, 55: 52-56.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993c). Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mold antigens. *Equine Vet J*, 25: 261-267.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993d). Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after “natural (hay and straw) challenges”. *Vet Immunol Immunopathol*, 363: 207-222.

McGorum BC, Dixon PM (1994). The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet Educ*, 6: 203-209.

Hodgson JL, Hodgson DR (2007). Collection and analysis of respiratory tract samples. In McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J (eds). *Equine*

Respiratory Medicine and Surgery. 1st ed. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 119-150.

Mc Kane SA, Rose RJ (1993). Radiographic determination of the location of a blindly passed bronchoalveolar lavage catheter. *Equine Vet Educ*, 5: 329-332.

Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-leguern G, Sandron D, Chrétien J, Huchon G (1984). Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am Rev Respir Dis*, 130:305-306.

Nicholls R, Pirie RS (2001). Filtration of bronchoalveolar lavage fluid results in the selective loss of cells. In: *Proceeding World Equine Airways Soc Symp*, pp 76.

Pickles KJ, Pirie S, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002a). Part 3: The effect of time, temperature and fixative on cytological assessment of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Equine Vet J*, 34 (3): 297-301.

Pickles KJ, Pirie S, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002b). Part 2: Comparison of smear and cytocentrifuged preparations of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Equine Vet J*, 34 (3): 292-296.

Pickles KJ, Pirie S, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002c). Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Equine Vet J*, 34 (3): 288-291.

Riley CB, Bolton JR, Mills JN, Thomas JB (1992). Cryptococcosis in seven horses. *Aust Vet J*, 69: 135-139.

Robinson NE (2001). International workshop on equine chronic airways disease Michigan State University 16-18 June 2002. *Equine Vet J*, 33: 5-19.

Rossier Y, Sweeny CR, Ziemer EL (1991). Bronchoalveolar lavage fluid cytologic findings in horses with pneumonia or pleuropneumonia. *JAVMA*, 198:1001-1004.

Roy MF, Lavoie JP (2003). Tools for diagnosis of equine respiratory disorders. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 19:1-17.

Rush B, Mair T (2004). *Equine respiratory diseases*. 1st Blackwell science Ltd, Blackwell Publishing Co, Oxford, UK.

Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, Crystal RG (1984). Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respire Dis*, 130: 650-658.

Sgorbini M, Fusar Bassini R, Attili AR, Preziuso S, Bizzeti M, Cuteri V, Corazza M (2010). Evaluation of cytology and bacteriology in BALF collected from healthy not performing horses after exposure to environmental allergens. *Proceedings of the XVI SIVE International Congress*, 29-31 January, Carrara (MS), Italy, pp. 262-263.

Sweeney CR, Beech J, Roby KW (1985). Bacterial isolated from tracheobronchial aspirates of healthy horses. *Am J Vet Res*, 46: 2562-2565.

Sweeney CR (1991). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 42: 220-226.

Sweeney CR, Beech J (1991). Bronchoalveolar lavage. In Beech J (ed). *Equine Respiratory Disorders*. Lea e Febiger, Philadelphia, USA, pp. 55-61.

Taylor FGR, Hillyer, MH (1997). *Diagnostic techniques in equine medicine*. Saunders, Philadelphia, USA, pp. 215-224.

Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg SR (1992). Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res*, 53:1376-1379.

Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg SR (1994). Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavage and unlavaged lung segments in horses. *Am J Vet Res*, 55:1501-1504.

Tremblay GM, Ferland C, Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y (1993). Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J*, 25: 194–197.

Viel L (1980). Structural-functional correlations of the lung in the normal light horse. MSc thesis University of Guelph Ontario, Canada.

Viel L, Hewson J, Smart N, Staempfli H, Parsons D, Baird J, Smart N, Prescott J (1999). Bacterial isolates from TA and BAL fluid using guarded or non-guarded endoscopy in racehorses. In: *Proceedings Comp Resp Soc Symp*, British Columbia, Canada.

Viel L, Hewson J (2003). Bronchoalveolar lavage. In: Robinson Ne (Ed). *Current Therapy in Equine medicine*. 5th ed Saunders Co, Philadelphia, USA, pp 407-411.

Whitwell KE e Greet TRC (1984). Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Vet J*, 16: 499-508.

Zinkl JD (2002). Lower respiratory tract. In Cowell RD e Tyler RD (eds). *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2nd Ed. Mosby, St. Luis, USA pp. 73-86.

Willcox M, Kervitsky A, Watterns LC, King TE Jr (1988). Quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage: comparison of cytocentrifuge preparation with the filter method. *Am Rev Respir Dis*, 138: 74-80.

PUBBLICAZIONI

1. Sgorbini M, Schirru F, Marmorini P, **Fusar Bassini R**, Corazza M (2009). Relation between APGAR scoring and some semeiotic parameters in 147 trotter foals at birth. *Proceedings of the 11th Congress of the World Equine Veterinary Association (WEVA)*, September 24-27th, Guarujá, SP, Brazil, p. 512.
2. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Attili AR, Prezioso S, Bizzeti M, Cuteri V, Corazza M (2010). Evaluation of cytology and bacteriology in BALF collected from healthy not performing horses after exposure to environmental allergens. *Proceedings of the XVI SIVE International Congress*, 29-31 January, Carrara (MS), Italy, pp. 262-263.
3. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Corazza M (2010). Ultrasound measurements of the dorsal subarachnoid space depth in healthy Amiata donkey foals during the first week of life. *Proceedings of the 12th Congress on New Findings in Equine Practice*, 11-13 November, Druento (TO), Italy, pp. 95-98.
4. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Citi S, Marmorini P, Corazza M (2007). Valutazione ecografia dell'involuzione delle strutture ombelicali nel puledro trotatore nella prima settimana di vita. *Atti Congresso Nazionale SISVET*, 26-29 settembre, Salsomaggiore Terme (PR), LXI: 215-216.
5. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Luchetti E, Crisci A, Corazza M (2009). Valutazione ecografica dell'involuzione delle strutture ombelicali in puledri di asino sorcino crociato dell'amiata nella prima settimana di vita. *Atti XV Congresso Nazionale SIVE*, 23-25 gennaio, Bologna (BO), pp. 223-224.
6. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Briganti A, Tognetti R, Corazza M (2010). Lavaggio broncoalveolare nel cavallo: confronto tra aliquote sequenziali e pool. *Atti Congresso nazionale SISVET*, 8-10 settembre, Asti (AT), LXIV: 272-274.

7. Briganti A, **Fusar Bassini R**, Sgorbini M, Portela DA, Breggi G (2010). La somministrazione di un bolo di lidocaina per via endovenosa diminuisce il riflesso tussigeno durante il BAL nel cavallo. *Atti Congresso nazionale SISVET*, 8-10 settembre, Asti (AT), LXIV: 335-337.
8. Sgorbini M, **Fusar Bassini R**, Casini L, Vitale V, Corazza M (2011). Endoscopia dinamica delle prime vie aeree su treadmill: studio retrospettivo di 72 casi (2003-2010). *Atti XVII Congresso Internazionale SIVE*, 4-6 Febbraio, Montesilvano (PE), p. 278.
9. Sgorbini M, Marianelli G, Magi A, Pellegrini D, Del Rosso A, **Fusar Bassini R**, Asproni P, Sbrana S, Ricardi G, Poli A (2011). Confronto tra esame citologico del liquido sinoviale ed esame istopatologico della capsula articolare in cavalli con OCD. *Atti XVII Congresso Internazionale SIVE*, 4-6 Febbraio, Montesilvano (PE), p. 260.
10. Sgorbini M, Stillitano S, Marmorini P, Di Maria S, Luchetti E, Rela S, **Fusar Bassini R**, Tognetti R, Corazza M (2011). Variazioni dell'esame emocromocitometrico e di alcuni parametri ematochimici nel puledro neonato dopo parto naturale e indotto. *Atti XVII Congresso Internazionale SIVE*, 4-6 Febbraio, Montesilvano (PE), p. 335.
11. Corazza M, **Fusar Bassini R**, Bonelli F, Sgorbini M (2012). Valutazione della ripetibilità nella lettura dei WBC e della quantità di muco nel BALF. *Atti Congresso nazionale SISVET*, 12-14 settembre, Roma, LXV: 257-260.